



Université de Montréal

**Le récepteur CD36: implication dans le développement de  
l'athérosclérose et dans le recrutement des leucocytes aux sites  
inflammatoires**

par

**Diala Harb**

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Philosophiae Doctor, Ph.D)  
en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie

8 Juin 2011

© Diala Harb, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

**Le récepteur CD36: implication dans le développement de l'athérosclérose et dans  
le recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires**

présentée par:

Diala Harb

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Céline Fiset

Présidente-rapporteur

Sylvie Marleau

Directrice de recherche

Huy Ong

Co-directeur de recherche

Jean-François Tanguay

Membre du jury

Pascal Bernatchez

Examineur externe

Yahye Merhi

Représentant du Doyen

## Résumé

Le CD36 est un récepteur éboueur de classe B exprimé par plusieurs types cellulaires dont les macrophages et les cellules endothéliales de la microvasculature. Le CD36 présente une haute affinité de liaison pour les ligands lipidiques tels que les lipoprotéines oxydées de basse densité (LDLox). De part sa capacité à internaliser les LDLox au niveau des macrophages et de son implication dans la formation des cellules spumeuses, le CD36 joue un rôle critique dans le développement des lésions athérosclérotiques. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le EP 80317, un ligand synthétique sélectif du CD36, exerce des effets anti-athérosclérotiques chez les souris déficientes en apolipoprotéine E. Un traitement prolongé (12 semaines) avec le EP 80317 réduit fortement (de 51%) la surface des lésions athérosclérotiques par comparaison aux souris témoins. L'effet anti-athérosclérotique est associé à une diminution des taux de cholestérol plasmatique, à une réduction de l'internalisation des LDLox au niveau des macrophages et à une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans le transport inverse du cholestérol. De plus, un traitement par le EP 80317 est également associé une diminution de l'expression aortique et plasmatique de protéines pro-inflammatoires. Nos études ont aussi montré un rôle pour le CD36 dans le recrutement des phagocytes mononucléés au niveau des lésions athérosclérotiques, tel que démontré par une réduction de l'accumulation des phagocytes mononucléés radiomarqués CD36<sup>-/-</sup> par rapport aux cellules CD36<sup>+/+</sup>. À l'échelle moléculaire, nous avons montré que les phospholipides oxydés induisent la phosphorylation de la kinase Pyk2 des podosomes des monocytes/macrophages de manière dépendante de l'expression du CD36 et de Src. Cette phosphorylation est atténuée par un traitement par le EP80317. Nos résultats appuient le rôle important du CD36 dans l'athérosclérose et

suggèrent que les ligands synthétiques qui modulent la fonction du CD36 représentent potentiellement une nouvelle classe d'agents anti-athérosclérotiques. Le CD36 exprimé par les cellules endothéliales de la microvasculature est un récepteur de l'hétérodimère protéique S100A8/A9. Ces protéines s'associent à l'acide arachidonique intracellulaire (AA) des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) et le complexe S100A8/A9/AA peut être sécrété par les PMN activés au contact de l'endothélium. Nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle le CD36 exprimé par la microvasculature est impliqué dans le métabolisme transcellulaire de l'AA par la liaison du complexe S100A8/A9/AA et la réponse inflammatoire. Chez deux modèles murins d'inflammation aiguë (ischémie/reperfusion des membres inférieurs et poche d'air dorsale), nous avons observé que la réponse inflammatoire, notamment l'accumulation des PMN au niveau des sites inflammatoires, est diminuée en moyenne de 63% chez les souris CD36<sup>-/-</sup>. De même, un traitement par le EP 80317 ou par les anticorps anti-S100A8/A9 diminue chacun de 60% en moyenne l'extravasation des PMN vers les tissus inflammatoires. L'administration simultanée des deux traitements n'a aucun effet supplémentaire, et ces traitements n'exercent aucun effet chez les souris CD36<sup>-/-</sup>. Nos résultats appuient le rôle du récepteur CD36 de la microvasculature dans la régulation de la réponse inflammatoire. L'utilisation des ligands synthétiques du CD36 pourrait représenter une nouvelle avenue thérapeutique dans le traitement des réponses inflammatoires aiguës.

**Mots-clés:** CD36, athérosclérose, sécrétines de l'hormone de croissance (growth hormone-releasing peptides), lipoprotéine oxydée de basse densité, macrophage, migration des phagocytes mononucléés, inflammation vasculaire, S100A8/A9, neutrophiles polymorphonucléés (PMN), ischémie/reperfusion.

## Abstract

CD36 is a class B scavenger receptor expressed by multiple cell types such as macrophages and microvascular endothelial cells. CD36 shows a high affinity binding towards lipid-based ligands such as oxidized low-density lipoproteins (oxLDL). Macrophage CD36 has been shown to play a critical role in the development of atherosclerotic lesions by its ability to internalize oxLDL and to lead to foam cell formation. We tested the hypothesis that EP 80317, a selective CD36 ligand, exerts anti-atherosclerotic effects in apolipoprotein E-deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice fed on atherogenic diet. Long term treatment (12 weeks) with EP 80317 results in a striking reduction (51%) of lesion areas in EP 80317-treated apoE<sup>-/-</sup> mice. This effect was associated with a decrease in plasma cholesterol, a reduced oxLDL internalization within macrophages and an up-regulation of proteins involved in cholesterol efflux. Additionally, treatment with EP 80317 was associated with a reduced expression of vascular and plasma pro-inflammatory proteins. Our studies also showed a role of CD36 in modulating the recruitment of mononuclear phagocytes to the arterial wall, as shown by a reduced migration of radiolabeled CD36<sup>-/-</sup> macrophages into atherosclerotic lesions compared to CD36<sup>+/+</sup> cells. At the molecular level, our studies showed that oxidized phospholipids induced the phosphorylation of the adhesion kinase Pyk2 in monocytes/macrophages, in a CD36- and Src-dependent manner. The Pyk2 phosphorylation is attenuated by treatment with EP80317. Our results strongly support the role of CD36 in atherosclerosis development and suggest that synthetic ligands featuring modulatory effect on CD36 function may represent a novel class of anti-atherosclerotic agents.

CD36 expressed by microvascular endothelial cells is a receptor for the heterodimer S100A8/A9. These proteins bind intracellular arachidonic acid (AA) within polymorphonuclear neutrophils (PMN) and the complex S100A8/A9-AA may be secreted at sites of inflammation where it exerts chemotactic activities. We aimed to delineate the role of microvascular CD36, as a receptor for the S100A8/A9, in the AA transcellular metabolism and the regulation of the associated PMN trafficking to inflammatory sites. In two mouse models of acute inflammation (hind limb ischemia/reperfusion and dorsal air pouch), CD36 regulated trafficking of PMN to inflammatory sites, as shown by a mean of 63% reduction of PMN accumulation in CD36<sup>-/-</sup> mice. Treatment with EP 80317 or with S100A8/A9 antibodies reduced, each by ~ 60%, the recruitment of PMN to inflammatory sites. The combined administration of anti-S100A8/A9 and EP 80317 did not exert any additional inhibitory effect and neither treatment featured a modulatory effect in CD36<sup>-/-</sup> mice. Our results strongly support a role for microvascular CD36 in regulating PMN trafficking to inflammatory sites. Targeting CD36 might represent a novel therapeutic avenue for the treatment of acute inflammatory responses.

**Keywords:** CD36, atherosclerosis, growth hormone-releasing peptides, oxidized low density lipoproteins, macrophage, mononuclear phagocyte trafficking, vascular inflammation, S100A8/A9, polymorphonuclear neutrophils, ischemia/reperfusion.

## Sommaire

<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>v</b>
<b>Sommaire .....</b>	<b>vii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>xvi</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>xvii</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>xxi</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xxviii</b>



## Table des matières

<b>Avant-propos .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>2</b>
<b>Chapitre 1. L'athérosclérose.....</b>	<b>3</b>
1.1. Introduction .....	3
1.2. Développement des plaques athérosclérotiques .....	4
1.2.1. Facteurs déclenchant le processus athérosclérotique .....	7
1.2.1.1. Hypothèse moderne de la réponse au dommage endothélial .....	7
1.2.1.2. Hypothèse de la réponse à la rétention des lipoprotéines .....	9
1.2.1.3. Hypothèse du stress oxydatif .....	11
1.2.1.3.1. Effets directs des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote .....	15
1.2.1.3.2. Effets pro-inflammatoires du LDLox et des phospholipides oxydés.....	18
a- Effets sur l'expression des molécules d'adhérence .....	19
b- Effets sur l'expression des chimiokines .....	19
c- Effets sur les monocytes/macrophages .....	20
d- Effets sur la génération des espèces réactives de l'oxygène .....	20
e- Effets sur l'état de coagulation .....	21
f- Effets sur les cellules musculaires lisses vasculaires .....	21
g- Effets angiogéniques.....	21
1.2.2. Recrutement des monocytes au niveau de l'espace sous-endothélial .....	22
1.2.2.1. Roulement des monocytes .....	24
a- Rôle des sélectines .....	24

b- Rôle des intégrines .....	25
1.2.2.2. Activation et arrêt des monocytes .....	25
1.2.2.3. Migration transendothéliale.....	27
1.2.2.4. Polarisation des leucocytes au cours de la migration .....	28
1.2.3. Internalisation des lipoprotéines modifiées par les macrophages: rôle des récepteurs éboueurs.....	29
1.2.3.1. Homéostasie du cholestérol .....	33
1.2.4. Hétérogénéité des macrophages au niveau des lésions athérosclérotiques.....	35
<b>Chapitre 2. Le récepteur CD36 .....</b>	<b>37</b>
2.1. Introduction .....	37
2.2. Expression du récepteur CD36 .....	41
2.3. Régulation de l'expression du CD36 .....	42
2.3.1. Facteurs qui augmentent l'expression du CD36 .....	42
2.3.2. Facteurs qui diminuent l'expression du CD36 .....	43
2.3.3. Trafic vésiculaire et ubiquitination du CD36 .....	44
2.4. Fonctions du récepteur CD36 .....	44
2.4.1. Fonction de récepteur éboueur ( <i>scavenger</i> ) .....	45
2.4.2. Fonction translocase des acides gras (FAT/CD36) .....	46
2.5. Signalisation cellulaire en aval du CD36 .....	48
2.5.1. Cellules endothéliales .....	49
2.5.2. Phagocytes .....	50
2.5.3. Microglies .....	51

2.5.4. Macrophages .....	51
2.5.5. Plaquettes .....	52
2.6. Rôle du récepteur CD36 dans l'athérosclérose .....	54
<b>Chapitre 3. Hypothèses, objectifs et méthodes .....</b>	<b>65</b>
3.1. Les sécrétines peptidiques de l'hormone de croissance en tant que ligands sélectifs du récepteur CD36 .....	65
3.2. Hypothèse de recherche .....	68
3.3. Objectifs .....	69
3.4. Modèles expérimentaux .....	70
<b>Résultats .....</b>	<b>75</b>
<b>Chapitre 4. Liste des publications .....</b>	<b>76</b>
4.1. Publications à titre de première auteure .....	76
4.2. Publications à titre de co-auteure .....	76
4.3. Abrégés publiés .....	77
<b>Chapitre 5. EP 80317, un ligand du récepteur CD36, protège les souris déficientes en apolipoprotéine E contre le développement des lésions athérosclérotiques .....</b>	<b>79</b>
5.1. Contributions à la publication .....	80
5.2. Résumé .....	80
5.3. Article I .....	82
<b>EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E- deficient mice from developing atherosclerotic lesions .....</b>	<b>82</b>

<b>Abstract .....</b>	<b>83</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>85</b>
<b>Materials and methods.....</b>	<b>87</b>
Mice and diets .....	87
Morphometric analysis of aortic lesions and histology .....	88
Plasma lipids analysis .....	88
Lipoproteins oxidation .....	88
DiI-labeled oxLDL internalization in macrophages .....	89
RT-PCR and Western blot of CD36, SRA, PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , ABCA1 and ABCG1 in peritoneal macrophages .....	89
Statistical analysis .....	91
<b>Results .....</b>	<b>92</b>
EP 80317 prevents atherosclerosis development in apoE <sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet .....	92
The anti-atherosclerotic properties of EP 80317 are CD36-dependent .....	93
EP 80317 shows curative effects in reducing atherosclerosis in apoE <sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet .....	93
The anti-atherosclerotic effects of EP 80317 are reversible .....	94
EP 80317 reduces oxLDL internalization and regulates the PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA1 pathway in macrophages .....	94
<b>Discussion .....</b>	<b>95</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>99</b>
<b>References .....</b>	<b>100</b>
<b>Legends to figures .....</b>	<b>107</b>
<b>Figures .....</b>	<b>110</b>
Figure 1 .....	110
Figure 2 .....	111
Figure 3 .....	112
Figure 4 .....	113
Figure 5 .....	114
 <b>Chapitre 6. Le rôle du récepteur CD36 dans la régulation du recrutement des phagocytes mononucléés au niveau des lésions athérosclérotiques et dans l'inflammation vasculaire .....</b>	 <b>115</b>
6.1. Avant-propos .....	116

6.2. Hypothèse de recherche .....	117
6.3. Objectifs .....	117
6.4. Méthodes .....	118
6.5. Contributions à la publication .....	121
6.6. Résumé .....	122
6.7. Article II .....	124

**The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation ..... 124**

<b>Abstract .....</b>	<b>125</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>127</b>
<b>2. Methods .....</b>	<b>129</b>
2.1. Animals .....	129
2.2. <sup>111</sup> Indium peritoneal macrophage labeling and <i>i.v.</i> injection .....	129
2.3. Plasma analysis .....	130
2.4. Cell culture .....	130
2.5. RT-PCR .....	131
2.6. Western Blot .....	131
2.7. Immunostaining .....	131
2.8. Statistical analysis .....	132
<b>3. Results .....</b>	<b>132</b>
3.1. EP 80317 reduced <sup>111</sup> In-labelled-macrophage recruitment to atherosclerotic lesions .....	132
3.2. EP 80317 reduced POVPC induced Pyk2 phosphorylation in macrophages.	132
3.3. POVPC-induced Pyk2 phosphorylation in macrophages is CD36- and Src-dependent .....	133
3.4. Reduced expression of plasma and vascular inflammatory proteins in EP 80317-treated mice .....	134
3.5. The effect of EP 80317 is CD36-dependent .....	135
<b>4. Discussion .....</b>	<b>135</b>
<b>Funding .....</b>	<b>140</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>141</b>
<b>Conflict of interest .....</b>	<b>141</b>
<b>References .....</b>	<b>142</b>
<b>Figure legends .....</b>	<b>150</b>

<b>Supplementary Data .....</b>	<b>153</b>
Materials.....	153
Radioactivity measurement.....	154
RT-PCR .....	154
Western Blot .....	155
Immunostaining .....	156
Flow cytometry analysis .....	157
LDL oxidation .....	157
Table I .....	158
<b>Figures .....</b>	<b>159</b>
Figure 1 .....	159
Figure 2 .....	160
Figure 3 .....	161
Figure 4 .....	162
Figure 4 Followed .....	163
Figure 5 .....	164
Figure 6 .....	165
<b>Résultats supplémentaires .....</b>	<b>166</b>
Figure S1 .....	166

<b>Chapitre 7. Le rôle du récepteur CD36 de la microvasculature endothéliale dans la régulation du recrutement des leucocytes polymorphonucléaires au niveau des sites inflammatoires aigus murins.....</b>	<b>167</b>
7.1. Avant-propos .....	168
7.2. Hypothèse de recherche .....	169
7.3. Objectifs .....	170
7.4. Méthodes .....	170
7.5. Contributions à la publication .....	173
7.6. Résumé .....	174
7.7. Article III .....	176

# Microvascular endothelial CD36 regulates polymorphonuclear leukocyte trafficking to acute inflammatory sites in mice: a role for myeloid-related proteins

<b>S100A8/A9 .....</b>	<b>176</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>177</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>179</b>
<b>2. Methods .....</b>	<b>180</b>
2.1. Materials .....	180
2.2. Animals .....	181
2.3. Unilateral hind limb ischemia and reperfusion in mice .....	182
2.4. Bioassay of PMN accumulation in dorsal air pouches .....	182
2.5. Whole blood chemiluminescence assay .....	183
2.6. Tissue MPO assay .....	183
2.7. Western blots .....	184
2.8. Statistical analysis .....	185
<b>3. Results .....</b>	<b>185</b>
3.1. Systemic administration of selective CD36 ligands reduced PMN accumulation in remote organs following hind limb I/R in a CD36-dependent manner .....	185
3.2. Blockade of S100A8/A9 activity reduced PMN activation and remote tissue accumulation in a CD36-dependent manner .....	187
3.3. Microvascular CD36 is involved in LPS-elicited PMN recruitment in the mouse air pouch .....	188
<b>4. Discussion .....</b>	<b>188</b>
<b>Funding .....</b>	<b>193</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>193</b>
<b>Conflict of interest .....</b>	<b>193</b>
<b>References.....</b>	<b>194</b>
<b>Figure Legends.....</b>	<b>201</b>
<b>Figures.....</b>	<b>204</b>
Figure 1 .....	204
Figure 2 .....	205
Figure 3 .....	206
Figure 4 .....	207
Figure 5 .....	208
Figure 6 .....	209
<b>Discussion, Conclusions et Perspectives .....</b>	<b>210</b>

<b>Chapitre 8. Discussion et conclusions .....</b>	<b>211</b>
8.1. Le récepteur CD36 des monocytes/macrophages: une nouvelle cible thérapeutique dans l'athérosclérose .....	212
8.2. Le rôle du CD36 dans le recrutement des phagocytes mononucléés au niveau des lésions athérosclérotiques .....	222
8.3. Le récepteur CD36 de la microvasculature: un récepteur pro-inflammatoire ....	233
8.4. Conclusions .....	239
<b>Chapitre 9. Perspectives générales .....</b>	<b>240</b>
<b>Références .....</b>	<b>243</b>



**Liste des tableaux**

<b>Tableau 1.</b> Modifications oxydatives du LDL .....	13
---	----

## Liste des figures

### Chapitre 1. L'athérosclérose

<b>Figure 1.</b> Structure de la paroi artérielle normale et athérosclérotique .....	4
<b>Figure 2.</b> L'athérosclérose, une maladie inflammatoire .....	6
<b>Figure 3.</b> Causes et conséquences du dysfonctionnement endothélial .....	8
<b>Figure 4.</b> Rétention endothéliale des lipoprotéines et athérosclérose. ....	11
<b>Figure 5.</b> Stress oxydatif vasculaire et modifications oxydatives du LDL par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) .....	15
<b>Figure 6.</b> Rôle des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans l'induction d'une inflammation vasculaire pro-athérosclérotique .....	17
<b>Figure 7.</b> Recrutement des monocytes et développement des cellules spumeuses .....	23
<b>Figure 8.</b> Ligands et contre-ligands impliqués dans les interactions leucocytes-cellules endothéliales et dans la migration des monocytes au niveau des lésions athérosclérotiques .....	27
<b>Figure 9.</b> Polarisation cellulaire, formation du front de migration et de l'uropode et migration .....	29
<b>Figure 10.</b> Classification des récepteurs éboueurs .....	30
<b>Figure 11.</b> Monocytes/Macrophages : éléments-clés dans le développement de l'athérosclérose .....	35

### Chapitre 2. Le récepteur CD36

<b>Figure 12.</b> Représentation schématique du gène CD36 .....	38
<b>Figure 13.</b> Représentation schématique de la protéine CD36 .....	41

<b>Figure 14.</b> Fonction translocase du CD36 et transfert des acides gras à longue chaîne.....	47
<b>Figure 15.</b> Voies de signalisation en aval du CD36 .....	54
<b>Figure 16.</b> Structures chimiques des PCox <sub>CD36</sub> .....	58
<b>Figure 17.</b> Les souris apoE <sup>-/-</sup> déficientes en CD36 sont protégées contre le développement de l'athérosclérose .....	60
<b>Figure 18.</b> Le CD36 exprimé au niveau des monocytes/macrophages est pro-athérogène.....	61
<b>Figure 19.</b> Les souris apoE <sup>-/-</sup> CD36 <sup>-/-</sup> sont protégées contre le développement de l'athérosclérose même à des stades avancés de la pathologie .....	62
<b>Chapitre 3. Hypothèses, objectifs et méthodes</b>	
<b>Figure 20.</b> Site de liaison de l'hexaréline sur le récepteur CD36 .....	67
<b>Figure 21.</b> A. Courbes de compétition des GHRPs avec la [125I]Tyr-Bpa-Ala-hexaréline pour la liaison au récepteur CD36 photomarké. B. Courbes de compétition du EP 80317 ou de la des-méthyle-hexaréline avec la ghréline pour la liaison au GHS-R1a .....	69
<b>Figure 22.</b> Formation des lésions athérosclérotiques chez les souris déficientes en apolipoprotéine E .....	72
<b>Figure 23.</b> Expression membranaire du CD36 par la lignée cellulaire monocyttaire RAW264.7 .....	120
<b>Chapitre 5. Article I. EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions</b>	

<b>Figure 1.</b> Effects of long-term (12 weeks) administration of EP 80317 in apoE <sup>-/-</sup> mice.....	110
<b>Figure 2.</b> Effects of long-term administration of EP 80317 in apoE/CD36 double-null mice .....	111
<b>Figure 3.</b> Curative effects of EP 80317 in apoE <sup>-/-</sup> mice .....	112
<b>Figure 4.</b> Reversibility of the effect of EP 80317 .....	113
<b>Figure 5.</b> Effect of EP 80317 on DiI-oxLDL internalization and gene expression of scavenger receptors, nuclear receptors and ABC transporters .....	114
<b>Chapitre 6. Article II. The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation</b>	
<b>Figure 1.</b> Effect of chronic administration of EP 80317 on <sup>111</sup> In-labelled macrophage accumulation to atherosclerotic lesions .....	159
<b>Figure 2.</b> Effect of EP 80317 or EP 51389 on POVPC-elicited Pyk2 phosphorylation.....	160
<b>Figure 3.</b> POVPC-induced Pyk2 phosphorylation is CD36- and Src-dependent .....	161
<b>Figure 4.</b> Effect of EP 80317 on inflammatory biomarker expression in the vascular wall .....	162-163
<b>Figure 5.</b> Accumulation of labelled-macrophages into aortae is CD36-dependent ...	164
<b>Figure 6.</b> Effect of EP 80317 on plasma inflammatory cytokines .....	165
<b>Figure S1.</b> Activation de Pyk2 induite par les phospholipides oxydés (PCox <sub>CD36</sub> ) au niveau des macrophages péritonéaux résidents de souris.....	166

**Chapitre 7. Article III. Microvascular endothelial CD36 regulates polymorphonuclear leukocyte trafficking to acute inflammatory sites in mice: a role for myeloid-related proteins S100A8/A9**

<b>Figure 1.</b> Schematic representation of experimental protocols and treatments .....	204
<b>Figure 2.</b> Effect of CD36 ligands on PMN accumulation in lungs following hind limb I/R .....	205
<b>Figure 3.</b> Effect of CD36 ligands on PMN accumulation in remote tissues following hind limb I/R .....	206
<b>Figure 4.</b> Effect of EP 80317 or neutralizing antibodies anti-S100A8/A9 on PMN priming/activation and accumulation in lungs following hind limb I/R .....	207
<b>Figure 5.</b> Effect of EP 80317 or neutralizing antibodies anti-S100A8/A9 on PMN on LPS-induced leukocyte recruitment in mouse air pouches .....	208
<b>Figure 6.</b> Hypothetical scheme of events leading to CD36-mediated regulation of PMN accumulation to inflammatory sites .....	209

## Liste des abréviations

$\alpha$ -TOH	$\alpha$ -tocophérol
AA	Acide arachidonique
A $\beta$	$\beta$ -amyloïde
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ACAT	Acyl CoA cholestérol acyltransférase
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ADAMTS1	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>
AG	Acide gras
AGE	Produit de glycation avancée
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	<i>5'AMP-activated protein kinase</i>
AP	Poche d'air
Apo	Apolipoprotéine
AVC	Accident vasculaire cérébral
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> (ou MCP-1, <i>Monocyte chemotactic protein-1</i> )
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> (ou RANTES, <i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i> )
CE	Cellules endothéliales
CLA-1	<i>CD36 and LIMP-2 analogous-1</i>
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
COX-1	Cyclooxygénase-1

CPT-I	Carnitine palmitoyltransférase I
CRP	Protéine C réactive
CS-1	<i>Connecting segment-1</i>
Cyp7a1	Cytochrome p7a1
CXCL3	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i>
dMEC	Cellules endothéliales de la microvasculature dermique
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMPs	Microparticules endothéliales
eNOS	Synthase endothéliale du monoxyde d'azote
FABPpm	Protéine de transport des acides gras associée à la membrane plasmique
FasL	Ligand Fas
FATP	Protéine de transport des acides gras ( <i>Fatty acid transport protein</i> )
HC	Hormone de croissance
GHRPs	Sécrétines de l'hormone de croissance ( <i>Growth Hormone-Releasing Peptides</i> )
GHS-R	Récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance
GP IV	Glycoprotéine IV
Graf	<i>GTPase regulator associated with focal adhesion kinase</i>
Grb7	<i>Growth factor receptor-bound protein 7</i>
GRO 1a	<i>Growth regulated oncogene 1 a chemokine</i>
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HFHC	Diète riche en lipides et en cholestérol ( <i>High fat high cholesterol diet</i> )
HIF-1	Facteur 1 $\alpha$ inductible par l'hypoxie

HO-1	Hème oxygénase-1
9-HODE	Acide 9-hydroxy-10,12-octadecadiénoïque
13-HODE	Acide 13-hydroxy-9,11-octadecadiénoïque
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
ICAM	Molécule d'adhérence intercellulaire
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire
IFN- $\gamma$	Interféron- $\gamma$
IGF-I	Facteur de croissance I <i>Insulin-like</i>
IL-8	Interleukine-8
In <sup>111</sup>	Indium 111
iNOS	Synthase inductible du monoxyde d'azote
I/R	Ischémie/Reperfusion
IRS1-4	Substrats 1-4 du récepteur de l'insuline
JAMA	Molécule d'adhérence des jonctions A
LCFA	Acides gras à longues chaînes
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LDLox	Lipoprotéine oxydée de basse densité
LDLmox	LDL minimalement oxydée
LDLmm	LDL minimalement modifiée
LDLR	Récepteur du LDL
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LIMP-2	<i>Lysosomal integral membrane protein-2</i>
LPO	Lipoxygénase



LPL	Lipoprotéine lipase
LRP	<i>LDL receptor related protein</i>
LTB4	Leucotriène B4
LXR $\alpha$	Récepteur X du foie $\alpha$
Lyso-PC	Lysophosphatidylcholine
MAPKs	Protéine kinases mitogéniques
MARCO	Récepteur du macrophage à structure collagénueuse
M-CSF	Facteur de stimulation des colonies de macrophages
MDA	Malonyldaldéhyde
MIP	Protéine inflammatoire du macrophage
MMP9	Métalloprotéinase 9
MSR	<i>Macrophage scavenger receptor</i>
NADPHox	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NCEH,	<i>Neutral cholesterol ester hydrolase</i>
NO	Monoxyde d'azote
Nrf2	<i>NF-E2-related factor-2</i>
NS	Non Significatif
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PAI	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
Pax	Paxilline
PCox	Phosphatidylcholine oxydée
PECAM	Molécule d'adhérence des plaquettes / cellules endothéliales

PG	Protéoglycanes
PGPC	1-palmitoyl-2-glutaryl- glycéro-3-phosphatidylcholine
PLA2	Phospholipase A2
PLs	Phospholipides
PLox	Phospholipide oxydé
PLC- $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PMN	Neutrophiles polymorphonucléés
POVPC	1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine
PPAR $\gamma$	Récepteur activé par les proliférateurs des peroxisomes $\gamma$
PPREs	Éléments de réponse de PPAR
Prdx2	Peroxiredoxine-2
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PUFA	Acides gras polyinsaturés
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
Pyk2	Protéine Tyrosine Kinase 2
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RXR	Récepteur X des rétinoïdes
SOD	Dismutase superoxyde
SR	Récepteur éboueur ( <i>Scavenger receptor</i> )
SR-BI	Récepteur éboueur B-I
SREBP-2	<i>Sterol response element binding protein-2</i>
SRCL	Récepteur éboueur avec lectine de type C

STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
SYK	Tyrosine kinase Spleen
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant $\beta$
TLR	Récepteur de type Toll
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale-alpha
TSP	Thrombospondine
TSR	<i>Thrombospondin repeat</i>
TX	Thromboxane
VCAM	Molécule d'adhérence vasculaire
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
VEGF-R	Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire
VLA4	<i>Very late antigen 4</i>
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
WT	<i>Wild type</i>
XO	Xanthine oxydase

*À ma très chère mère*

*À mon père, ma sœur, mon mari et toute  
ma famille*

*À Ryan et Angie*

*À Sylvie*

## Remerciements

J'aimerais d'abord remercier Dr Pascal Bernatchez, Dr Jean-François Tanguay et Dre Céline Fiset pour avoir accepté de participer à l'évaluation de cette thèse. Merci infiniment!

J'aimerais remercier mes directeurs de recherche, Dre Sylvie Marleau et Dr Huy Ong pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires et m'avoir encadrée pendant six ans.

Dr Ong, je ne pourrais jamais vous remercier suffisamment pour tout le support que vous m'avez offert à tous les niveaux. Je vous remercie pour m'avoir appris à me pousser plus loin que mes limites et à m'avoir guidée à acquérir une maturité scientifique et un esprit critique. Si je regarde six ans en arrière, je réalise l'impact positif que mon passage dans votre laboratoire a amené dans ma vie personnelle et professionnelle. Je suis tellement chanceuse de vous avoir eu comme directeur de recherche. Je vous en suis reconnaissante pour toujours!

Chère Sylvie, des pages et des pages ne seront jamais suffisantes pour vous remercier. Merci pour votre exceptionnel et excellent encadrement. Merci pour m'avoir aidée à développer mon esprit critique et mon leadership. Merci pour votre confiance et votre patience. Merci pour tout le support personnel et professionnel. Merci pour m'avoir toujours rappelée de voir la lumière au fond du tunnel. Merci pour avoir été une directrice de recherche et une amie. Je ne pourrais jamais trouver les bons mots pour vous exprimer toute la gratitude et la reconnaissance que j'ai pour vous. Je vous dédie cette thèse et vous remercie pour tout le dévouement que vous avez montré pour l'avancement de mes travaux.

J'aimerais remercier tous les membres de laboratoire, surtout Mukandila Mulumba, David Huynh et Katia Mellal pour le support technique. Merci aussi à Valérie Bessi, Kim Bujold, Christian Jossart, Caroline Bélanger, Hanan El Imam, Petra Pohankova, Ève-Marie Charbonneau, Roxanne Grégoire-Taillefer et Jessica Fiset.

Merci aux Drs Martin Sirois, Daniel Lévesque et Marc Servant pour m'avoir évaluée durant mon doctorat.

Merci à Dre Maria Febbraio pour son support scientifique.

Merci à Mme Andrée Mathieu pour son support académique.

Merci à Mme Leila Andraos.

## **Avant-propos**

Cette thèse porte sur l'étude du rôle du récepteur CD36 dans le développement de l'athérosclérose et dans la régulation de la migration des leucocytes en circulation au niveau des sites inflammatoires. Nos résultats sont présentés sous forme d'articles. Afin de mieux comprendre la problématique liée à nos études, le chapitre d'introduction portera sur le développement de l'athérosclérose et décrira le récepteur CD36 et ses principales fonctions.

# Introduction

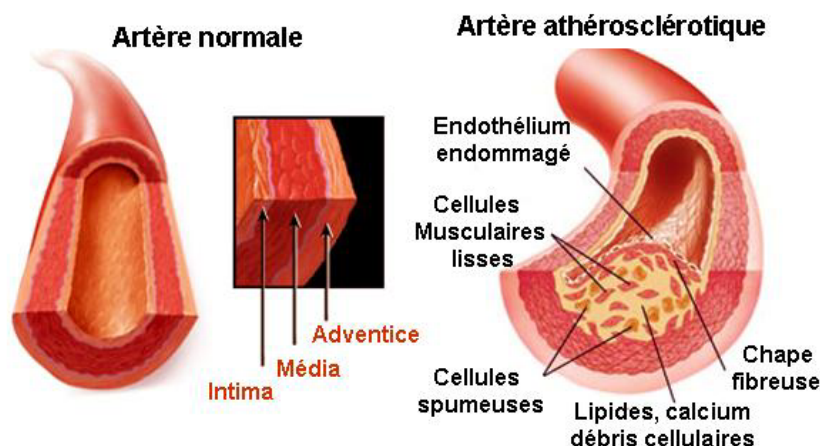


## **Chapitre 1. L'athérosclérose**

### **1.1. Introduction**

Les maladies cardiovasculaires se définissent comme les maladies et les blessures infligées au système cardiovasculaire: le cœur, les vaisseaux sanguins du cœur et le système circulatoire (veines et artères) dans l'ensemble du corps et à l'intérieur du cerveau (Fondation des maladies du cœur du Canada). Selon l'«Atlas des cardiopathies et des accidents vasculaires cérébraux», les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de décès dans le monde et sont responsables de la perte de 18% d'années de vie corrigées de l'incapacité dans les pays industrialisés (Mackay and Mensah, 2004). Au Canada, une personne succombe à une maladie du cœur ou à un accident vasculaire cérébral (AVC) à toutes les sept minutes, élevant ainsi à 31% la part des maladies cardiovasculaires à l'ensemble de tous les décès en 2005 (Statistiques Canada, 2009). Les maladies cardiovasculaires imposent un lourd fardeau au système de santé et coûtent à l'économie canadienne plus de 22,2 milliards de dollars annuellement en services médicaux, en coûts hospitaliers, en perte de salaire et en perte de productivité (Pour un Canada au cœur qui bat, 2009). Les accidents ischémiques aigus (mort subite, infarctus du myocarde, AVC) sont dans la majorité des cas la traduction clinique de l'athérosclérose, une pathologie des grosses et moyennes artères se caractérisant par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans la paroi artérielle et entraînant le rétrécissement progressif des vaisseaux et l'ischémie des organes correspondants (Figure 1). Les traitements actuels de l'athérosclérose visent à en maîtriser les facteurs de risque, dont principalement les taux élevés de cholestérol plasmatique. Cependant, les médicaments utilisés, tels que les statines, diminuent la mortalité cardiovasculaire

chez seulement un tiers des sujets traités (Morozova et al., 2004). L'identification des mécanismes clés impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose est d'une grande importance, le but étant de développer de nouvelles approches médicamenteuses visant à empêcher le développement et/ou l'instabilité des plaques athérosclérotiques.



**Figure 1. Structure de la paroi artérielle normale et athérosclérotique** (figure traduite de Encyclopaedia Britannica).

## 1.2. Développement des plaques athérosclérotiques

L'athérosclérose est un processus d'origine multifactorielle résultant d'une interaction dynamique entre la paroi des vaisseaux, les lipoprotéines circulantes et le système immunitaire. Aujourd'hui, l'athérosclérose est considérée une maladie inflammatoire (Packard et al., 2009; Weber et al., 2008; Hansson and Libby, 2006; Fan and Watanabe, 2003; Libby, 2002) (Figure 2) et la description anatomique moderne de la pathologie retient les étapes successives ou concomitantes suivantes: i) l'infiltration des lipoprotéines athérogènes dans l'espace sous-endothélial et la modification de ces dernières, telle que leur oxydation, ii) le recrutement des monocytes et leur

différentiation en macrophages, iii) l'internalisation des lipoprotéines oxydées (LDLox) par les macrophages, leur transformation en cellules spumeuses et la formation du cœur lipidique et nécrotique, iv) l'isolement de la lésion par une chape fibromusculaire et la calcification de la lésion (Bonnet, 2005) (Figure 2).

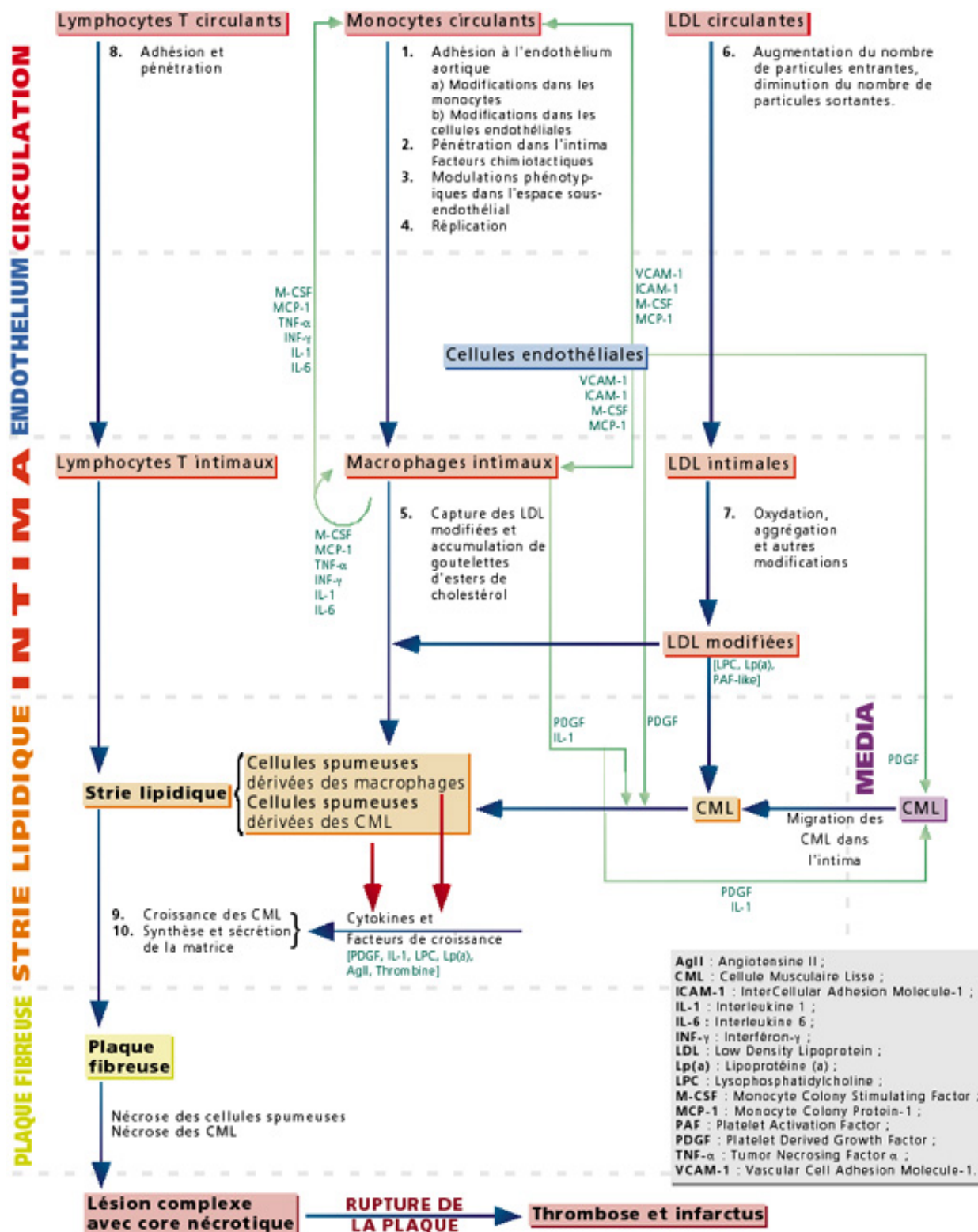


Figure 2. L'athérosclérose, une maladie inflammatoire (Tiré de Léoni. *Physiopathologie de l'athérosclérose- Mécanismes et prévention de l'athérombose*. <http://www.123bio.net/revues/jleoni/2chap4.html>)

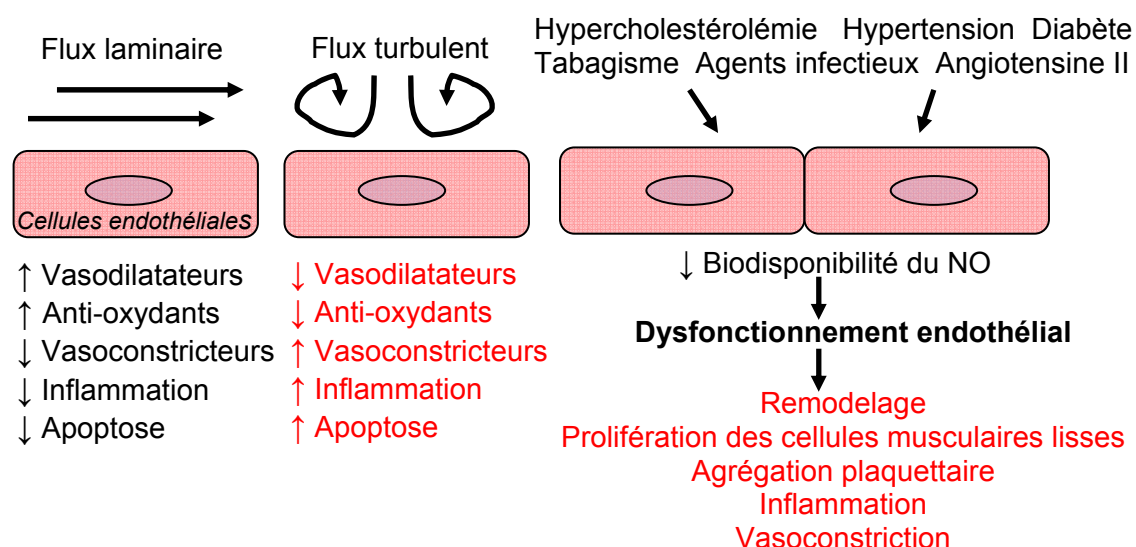
### **1.2.1. Facteurs déclenchant le processus athérosclérotique**

Au cours des dernières années, beaucoup d'efforts ont été déployés afin d'expliquer la pathogenèse et l'étiologie de l'athérosclérose. Trois hypothèses différentes mettant l'accent sur différents concepts considérés nécessaires et suffisants pour déclencher le processus athérosclérotique ont émergé: 1) hypothèse de la réponse au dommage endothélial (*response-to-injury*), 2) hypothèse de la réponse à la rétention endothéliale des lipoprotéines (*response-to-retention*), et 3) hypothèse des modifications oxydatives.

#### **1.2.1.1. Hypothèse moderne de la réponse au dommage endothélial**

Cette hypothèse considère qu'un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire serait le *primum movens* de l'athérosclérose. Ainsi, certains sites vasculaires, telles que les bifurcations artérielles, les courbures et l'origine des branches, sont susceptibles à la formation de la plaque d'athérome du fait qu'ils présentent une diminution du flux laminaire, une augmentation du flux turbulent et des forces de cisaillement qui peuvent directement induire une activation endothéliale (Figure 3). De plus, plusieurs facteurs de risque de l'athérosclérose (tabagisme, hyperlipidémie, obésité, diabète, hypertension, résistance à l'insuline, agents infectieux) sont associés à un stress oxydatif élevé qui entraîne un dysfonctionnement endothélial (Cai and Harrison, 2000; Bonetti et al., 2003) (Figure 3). La dysfonction endothéliale est caractérisée principalement par i) une réduction de la biodisponibilité des vasodilatateurs, essentiellement le monoxyde d'azote (NO), ii) une augmentation de la production de vasoconstricteurs, tels que l'endothéline-1 (Bonetti et al., 2003), iii) une augmentation de l'expression des

molécules d'adhérence endothéliales, telles que la molécule d'adhérence intercellulaire (ICAM-1) et vasculaire (VCAM-1), iv) une altération de la perméabilité vasculaire, v) une activité procoagulante, et vi) une sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance (Anderson, 1999) (Figure 3). La dysfonction endothéliale favorise ainsi l'infiltration des LDL, l'adhésion des leucocytes mononucléés et leur migration au niveau de l'espace sous-intimal, déclenchant de la sorte le processus athérosclérotique (Ross, 1999).



**Figure 3. Causes et conséquences du dysfonctionnement endothélial** [figure modifiée de Kinlay et al., 2001 (gauche) et Cai and Harrison, 2000 (droite)] [Kinlay et al. *Curr Opin Lipidol.* 2001; 12, 383-389, with permission of Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; Cai and Harrison. *Circ. Res.* 2000; 87, 840-844, with permission of Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins].

L'hypothèse de réponse au dommage endothélial n'est pas universellement acceptée, puisque même une artère normale, ne présentant aucun dysfonctionnement endothélial, peut permettre le passage du LDL athérogénique dans l'espace sous-endothélial (Stocker and Keaney, 2004; Schwenke and Carew, 1989). Ces observations ont conduit

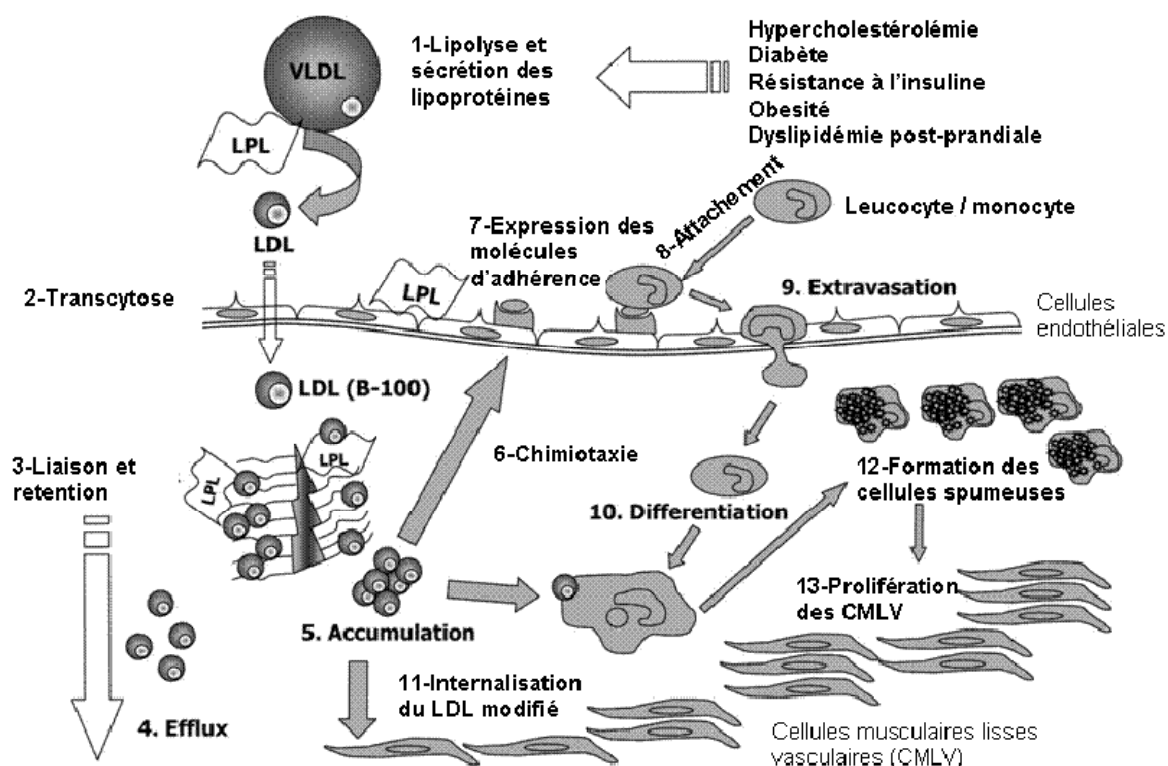
à la formulation d'autres hypothèses décrivant les facteurs déclenchant de l'athérosclérose.

#### **1.2.1.2. Hypothèse de la réponse à la rétention des lipoprotéines**

Cette hypothèse suggère que l'accumulation des lipoprotéines au niveau intimal est le facteur déclenchant la formation de cellules spumeuses (Schwenke and Carew, 1989). L'accumulation des LDL reflète un déséquilibre entre leurs flux d'entrée et de sortie et peut résulter de l'élévation des concentrations plasmatiques de LDL ainsi que de la synthèse accrue de certains protéoglycanes de la matrice extracellulaire au niveau sous-endothélial (Nakashima et al., 2008). Au niveau de ces sites, les lipoprotéines de diamètre  $<70$  nm, tels que les LDL, les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et les chylomicrons *remnants* pourraient passer au niveau sous-endothélial par transcytose (Gustafsson and Boren, 2004). D'autres lipoprotéines, telles que les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) peuvent être réduites en taille sous l'action de la lipoprotéine lipase ce qui leur permet de passer au niveau de l'intima (Stocker and Keaney, 2004). La rétention des lipoprotéines dans l'espace intimal est facilitée par des interactions ioniques entre les chaînes glycosaminoglycanes chargées négativement des protéoglycanes, surtout les versicanes (Wight and Merrilees, 2004), les biglycanes et les décorines (Gustafsson and Boren, 2004) et les résidus chargés positivement de l'apolipoprotéine B100 et l'apolipoprotéine B48 (Camejo et al., 1993, Tannock and Chait, 2004). De plus, la lipoprotéine lipase (LPL), produite par les macrophages et les cellules musculaires lisses vasculaires, peut se retrouver au niveau de la matrice extracellulaire, augmentant ainsi l'adhérence des LDL aux cellules endothéliales et leur

affinité aux protéoglycanes (Pentikäinen et al., 2002). Les formes oxydées du LDL liées aux protéoglycanes sont alors avidement internalisées par les macrophages et les cellules musculaires lisses vasculaires pour former des cellules spumeuses (Nakashima et al., 2008; Gustafsson and Boren, 2004; Ismail et al., 1994) (Figure 4). De plus, les LDL immobilisées dans la matrice extracellulaire sous-endothéliale peuvent subir une dégradation enzymatique, avec génération de particules non oxydées capables d'activer le complément et d'induire une réponse inflammatoire au niveau des macrophages et des cellules vasculaires (Klouche et al., 2000). Notons également qu'une fois retenus dans la paroi artérielle, les LDL peuvent former des micro-agrégats (Tamminen et al., 1999) sous l'action de diverses enzymes dont la sphingomyélinase (Gustafsson and Boren, 2004; Oorni et al., 2000), la phospholipase A2 sécrétée (sPLA2) (Hakala et al., 2001; Wooton-Kee et al., 2004) ainsi que les enzymes lysosomales telles que la cathepsine D et la lipase acide lysosomale (Hakala et al., 2003). Les LDL sous formes d'agréats sont internalisés par les macrophages, défaits par la plasmine et re-expulsés du macrophage pour être oxydées (Zhang et al., 2000).





**Figure 4. Rétention endothéliale des lipoprotéines et athérosclérose.** Cette figure illustre le rôle important de l'ancrage des LDL aux protéoglycanes vasculaires. La rétention vasculaire des lipoprotéines entraîne des modifications pathophysiologiques de ces dernières, incluant leur oxydation (figure traduite de Stocker and Keaney, 2004) [From Proctor. *Curr Opin Lipidol*, 2002. *Current Opinion*, as modified in Stocker. *Physiol Rev* 2004. *Am Physiol Soc*, used with permission; Proctor et al. *Curr Opin Lipidol*. 2002 13(5):461-70, with permission of Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins].

### 1.2.1.3. Hypothèse du stress oxydatif

Cette théorie propose que l'oxydation des LDL est un événement précoce de l'athérosclérose et que le stress oxydatif ainsi que les formes oxydées du LDL contribuent à l'athérogenèse en déclenchant une réponse inflammatoire (Stocker and Keaney, 2004; Chisolm and Steinberg, 2000). Les observations à l'appui de la théorie des modifications oxydatives dans la pathogénèse de l'athérosclérose comprennent: i) la présence du LDLox au niveau des plaques athérosclérotiques humaine et animale *in vivo*

(Chisolm and Steinberg, 2000), ii) la présence de LDLox et d'anticorps anti-LDLox dans la circulation systémique (Holvoet et al., 1998 ; Bui et al., 1996), iii) l'induction *in vitro* par le LDLox ou de ses constituants de réponses biologiques inflammatoires qui miment celles responsables du développement de l'athérosclérose *in vivo* (Steinberg, 2009), iv) l'immunoréactivité des anticorps dirigés contre les LDLox oxydées avec des segments de lésions athérosclérotiques et non avec des segments d'artère saine (Shaw et al., 2001), v) les résultats observés dans les modèles animaux déficients en protéines ou systèmes enzymatiques impliqués dans la formation des cellules spumeuses (tel que les souris apoE<sup>-/-</sup> déficientes en CD36) (Febbraio et al., 2000) et dans le stress oxydatif (tel que les souris apoE<sup>-/-</sup> déficientes en lipoxigénase-12/15) (Zhao et al., 2005). Ainsi, il est proposé que le LDL passe dans l'espace sous-endothélial où il subit des modifications oxydatives amenant d'abord à la formation de formes modérément modifiées (LDLmm «minimally modified LDL») puis fortement oxydées (LDLox) (Tableau 1). Cette oxydation serait déclenchée par les cellules de la paroi artérielle (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, macrophages) et implique la génération des radicaux libres oxygénés (ROS, pour *reactive oxygen species*) et nitrosylés (RSN, pour *reactive nitrogen species*) (Stocker and Keaney, 2004). La peroxydation du LDL par les radicaux libres conduit à la déplétion des antioxydants endogènes de la particule, tels que le  $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -TOH) et à l'accumulation d'hydroperoxydes lipidiques (LOOH). La dégradation des LOOH en aldéhydes réactifs et la perte des acides gras polyinsaturés (PUFA, pour *polyunsaturated fatty acid*) induit la formation des LDLmm (Stocker and Keaney, 2004). La présence de ROS/RNS et de LDLmm dans l'espace sous-endothélial stimule la production de protéines inflammatoires (*monocyte colony stimulating factor*,

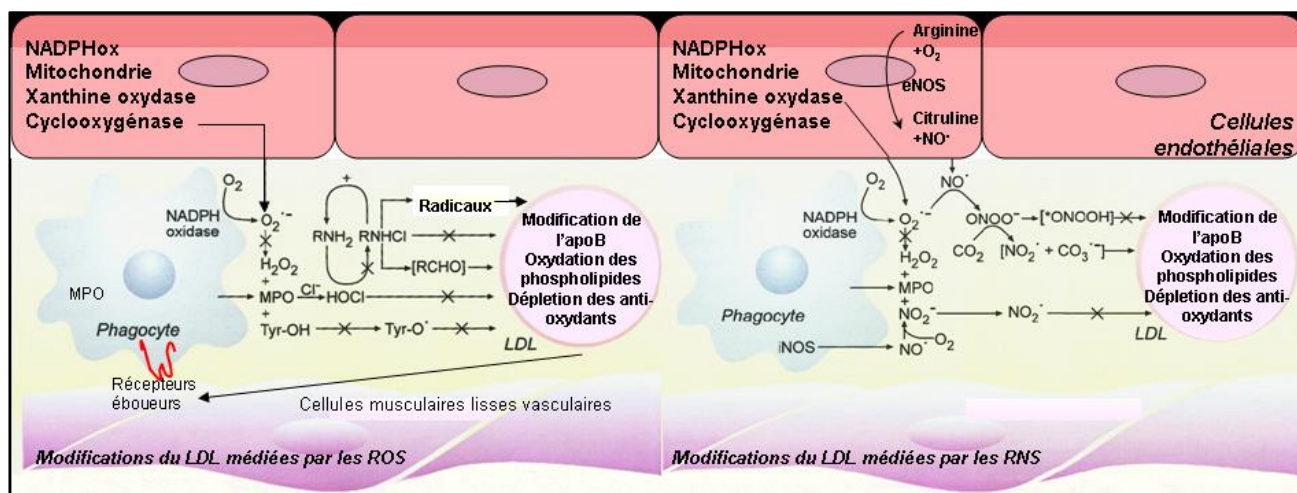
MCSF; *Chemokine (C-C motif) ligand 2*, CCL2) qui favorisent le recrutement des monocytes, leur migration à travers la paroi endothéliale, leur différenciation en macrophages ainsi que la séquestration de ces derniers dans l'espace sous-endothélial (Lusis, 2000, Libby, 2002). L'accumulation de macrophages amplifie le stress oxydatif et favorise une oxydation plus avancée des LDL (Diaz et al., 1997) avec modification de l'apolipoprotéine B et une augmentation de sa charge négative. Cette modification donne naissance à une forme oxydée qui n'est plus reconnue par le récepteur des LDL natives mais par les récepteurs éboueurs des macrophages qui l'internalisent (Steinberg, 2009) dont essentiellement le récepteur CD36 (Endemann et al., 1993, Greaves and Gordon, 2009).

Modifications oxydatives du LDL
<b><i>Apolipoprotéine B</i></b> Carbonylation, fragmentation, oxydation Formation d'adduits entre les fonctions amines et des produits de décomposition
<b><i>Partie lipidique</i></b> Consommation des anti-oxydants Consommation des acides gras polyinsaturés Formation de diènes conjugués Formation de produits d'oxydation lipidique Hydroperoxydes de phospholipides et d'esters de cholestérol Isoprostanes Oxystérols Lysophosphatidylcholine Phospholipides oxydés à courte chaîne Formation de produits de décomposition (aldéhydes)

**Tableau 1. Modifications oxydatives du LDL** (Beaudeux et al., 2006) [Reprinted from *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2006. 21(3), Beaudeux JL, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Peynet J. *Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose*, Pages 144-150, Copyright (2006), with permission from Elsevier].

La production des ROS ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ) et des RNS ( $\bullet NO$ ,  $\bullet ONOO^-$ ) au sein des différentes cellules de la paroi vasculaire est continue. Dans les tissus normaux, les ROS sont détoxifiés par les enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase, ainsi que par les capteurs des radicaux libres présents dans le fluide extracellulaire (bilirubine, acide urique) (Granger et al., 2004). Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense antioxydants, au profit des premiers. Cet équilibre peut être rompu sous l'effet de certains stimuli pathologiques endogènes (hyperlipoprotéinémie, hypertension, diabète) ou exogènes (infection, tabagisme) (Beaudeau et al., 2006). Les enzymes oxydantes sont divisées en trois groupes (Stocker and Keaney, 2004; Spitaler and Graier, 2002); le premier groupe comporte les enzymes actives de façon constitutive, telles que la cyclooxygénase-1 (COX-1), les lipoxygénases (LPO), le cytochrome P450, la xanthine oxydase (XO) et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPHox), qui catalysent la production d'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , ainsi que la synthase endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS). Le deuxième groupe comporte des enzymes dont les activités sont augmentées en conditions physiopathologiques, telles que la synthase du thromboxane (TX), la COX-2 et la forme inductible de la synthase du monoxyde d'azote (iNOS). Les enzymes du troisième groupe sont celles des cellules migratrices, dont les monocytes/macrophages, telles que la NADPHox leucocytaire, la iNOS et la myéloperoxydase (MPO) (Beaudeau et al., 2006). Le stress oxydatif s'accompagne par un dysfonctionnement et une inflammation vasculaires qui sont médiés soit directement par les ROS/RNS, soit par les LDL ayant subi une oxydation sous l'action des radicaux libres et des systèmes

enzymatiques cellulaires (telles que la MPO monocytaire) (Bonnefont-Rousselot et al., 2003) (Figure 5).

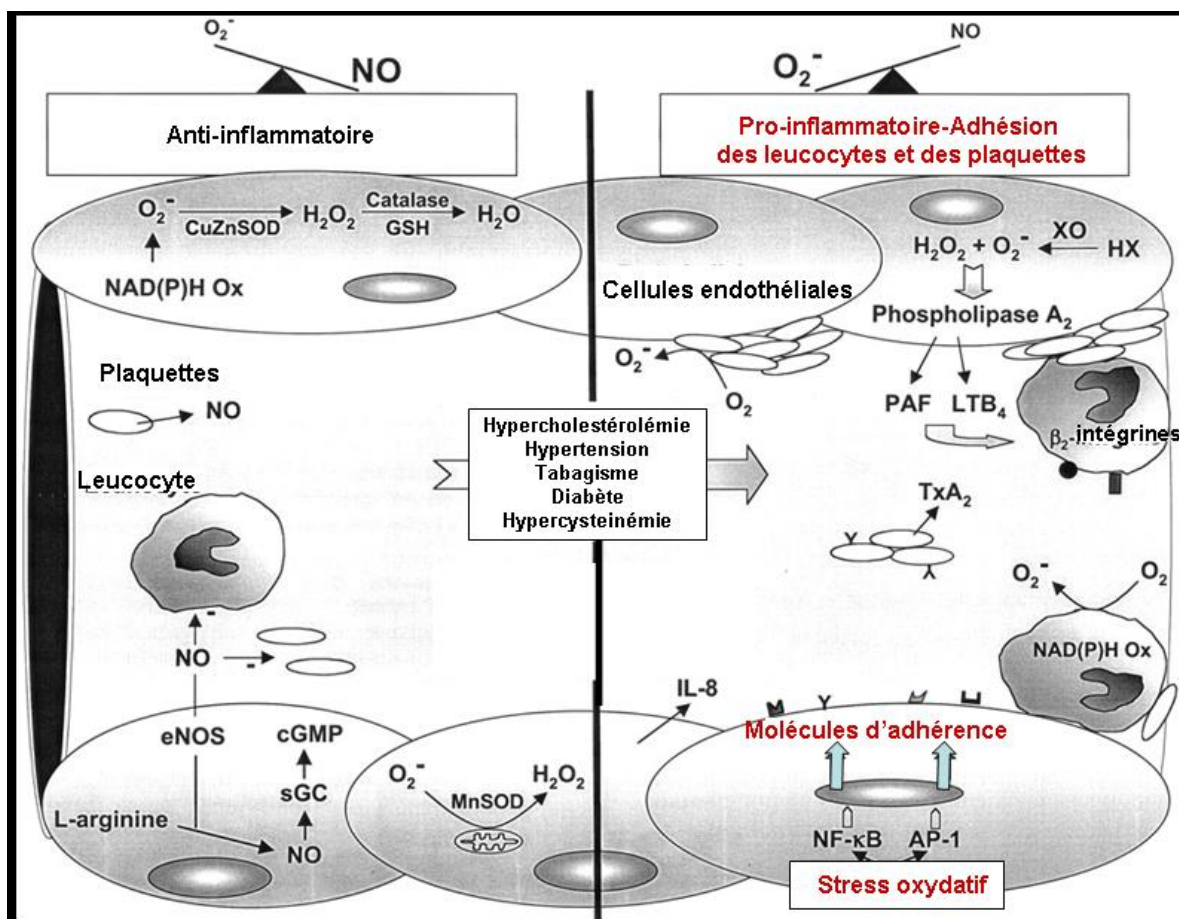


**Figure 5. Stress oxydatif vasculaire et modifications oxydatives du LDL par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS).** Les ROS induisent l'oxydation de la partie protéique et lipidique du LDL et la déplétion des anti-oxydants des lipoprotéines (figure modifiée et traduite de Carr et al., 2000) [Carr et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1716-1723, with permission of Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins].

#### 1.2.1.3.1. Effets directs des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les ROS peuvent favoriser l'adhésion des cellules à l'endothélium en induisant la production de médiateurs inflammatoires (Cooper et al., 2002). De plus, les ROS sont capables de stimuler l'activité des phospholipases des cellules vasculaires par des mécanismes kinase-dépendants (Natarajan et al., 1998), libérant des acides gras tels que l'acide arachidonique et stimulant la génération du facteur d'activation plaquettaire (PAF, *platelet-activating factor*) (Granger et al., 2004). Ces derniers sont fortement chimiotactiques et stimulent l'expression et l'activation de l'intégrine-β2 sur la membrane plasmique des leucocytes, ce qui augmente l'attachement des leucocytes aux

cellules endothéliales (Granger et al., 2004). Par libération de l'acide arachidonique, les ROS stimulent le recrutement et l'assemblage des sous-unités p47phox et p67phox de la NADPHox et l'activation de cette dernière (Meyer and Schmitt, 2000). Le stress oxydatif active également les facteurs de transcription nucléaires sensibles aux ROS, dont le NF- $\kappa$ B et l'AP-1, ce qui induit l'expression de certaines molécules d'adhérence endothéliales, telles que la sélectine-E, l'*intercellular cell adhesion molecule* (ICAM-1) et le *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1). De plus, les ROS peuvent mobiliser les molécules d'adhérence à partir des réserves intracellulaires dans les leucocytes (CD11b/CD18), les plaquettes et les cellules endothéliales (sélectine-P), ce qui pourrait expliquer le recrutement rapide des leucocytes au niveau des tissus inflammatoires (Granger et al., 2004) (Figure 6). Les ROS peuvent aussi réguler l'activité des protéines kinases et phosphatases des cellules endothéliales, telles que la protéine kinase C (PKC), la protéine tyrosine phosphatase 1 B (PTP1B) et la protéine tyrosine kinase 2 (PyK2) (Nourshargh et al., 2010). Ces dernières peuvent contrôler la phosphorylation des protéines de jonctions, telles que les cadhérines vasculaires endothéliales (cadhérines VE), réduisant ainsi le contact entre les cellules endothéliales et facilitant la migration paracellulaire des leucocytes (Nourshargh et al., 2010).



**Figure 6. Rôle des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans l'induction d'une inflammation vasculaire pro-athérosclérotique.** Cette figure montre le rôle important du stress oxydatif dans l'induction de l'expression des molécules d'adhérence vasculaires et la synthèse des facteurs chimiotactiques qui stimulent le recrutement des leucocytes (figure traduite de Granger et al., 2004) [Granger et al., *Hypertension* 2004; 43: 924-931, with permission of Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins].

Les ROS et RNS agissent également sur les voies de signalisation *redox-sensibles* des cellules vasculaires (Bonnefont-Rousselot et al., 2003). Par exemple, l'activation de la NADPHox endothéliale par l'angiotensine II induit la production de ROS qui activent les protéines kinases mitogéniques (MAPKs) et les kinases de survie cellulaire

Akt/protéine kinase B, et entraîne l'hypertrophie des cellules musculaires lisses (Ushio-Fukai et al., 1999). Les ROS formées par la NADPHox des cellules musculaires lisses sont également impliquées dans l'activation d'un état prothrombotique suite à l'activation du facteur de transcription HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) et l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (Gorlach et al., 2001; Herkert et al., 2002). L'anion superoxyde produit par la NADPHox provoque l'apoptose cellulaire et la constriction des cellules musculaires lisses, et ceci même en présence du NO ou des enzymes anti-oxydantes (par exemple, SOD) (Meyer and Schmitt, 2000). De plus, des niveaux élevés de LDL activent la phospholipase A2 (PLA2) qui libère l'acide arachidonique (AA) membranaire qui pourrait activer la translocation des sous-unités cytosoliques de la NADPHox à la membrane et entraîner l'activation de l'enzyme (O'Donnell et al., 2003). Également, l' $O_2^-$  produit par la NADPHox déclenche une boucle positive par activation de la PLA2, active la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et l'expression des molécules d'adhérence par les cellules endothéliales, et augmente l'endocytose du LDL par les cellules endothéliales (Holland et al., 1996). De plus, pendant leur transit à travers les cellules endothéliales, les LDL exposées au  $O_2^-$  peuvent être oxydées au niveau de la membrane abluminale, conduisant ainsi à la formation de formes athérogènes du LDL avant même leur entrée dans l'espace sous-endothélial (Meyer and Schmitt, 2000).

#### **1.2.1.3.2. Effets pro-inflammatoires du LDLox et des phospholipides oxydés**

Le LDL oxydé ainsi que les produits qui dérivent de son oxydation tels que les phospholipides oxydés (Plox) exercent de puissants effets athérosclérotiques et



inflammatoires, en stimulant différents types cellulaires dont les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses de la vasculature (Bochkov et al., 2010; Ashraf et al., 2009; Berliner and Gharavi, 2008; Leitinger, 2005).

#### **a- Effets sur l'expression des molécules d'adhérence**

Le LDLmm et ses phospholipides oxydés de la famille du 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine (PAPCox), incluant les 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POVPC), 1-palmitoyl-2-glutaroyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (PGPC) sont des activateurs des cellules endothéliales (CE) et des stimulateurs de l'adhésion des leucocytes (Ashraf et al., 2009; Berliner and Gharavi, 2008; Leitinger, 2005). Les PAPCox induisent l'expression au niveau de la surface apicale des CE du domaine CS-1 (*connecting segment-1*) de la fibronectine qui sert comme ligand de l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  (VLA-4) des monocytes (Shih et al., 1999; Berliner and Gharavi, 2008). De plus, le LDLmm et ses PLox augmentent l'expression de la sélectine-P au niveau des CE par induction de la translocation membranaire de la sélectine à partir des réservoirs intracellulaires (Vora et al., 1997; Bochkov et al., 2010).

#### **b- Effets sur l'expression des chimiokines**

Les PAPCox induisent l'expression de nombreuses chimiokines au niveau des CE et des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Bochkov et al., 2010) incluant la chimiokine CCL-2, les protéine inflammatoire du macrophage MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , la *Chemokine (C-X-C motif) ligand 3* (CXCL3) et l'interleukine-8 (IL-8)

(Gargalovic et al., 2006) dont certains sont fortement chimiotactiques pour les leucocytes mononucléés (CCL-2, CCL-5, CXCL-3, CXCL-14) (Bochkov et al., 2010). De plus, les monocytes et les macrophages stimulés par les PAPCox sécrètent le VEGF-A qui, en plus de son effet angiogénique, exerce un effet chimiotactique envers les monocytes (Barleon et al., 1996) et induit l'expression endothéliale de VCAM-1 et de la molécule d'adhérence des plaquettes / cellules endothéliales-1 (PECAM-1) (Bochkov et al., 2010).

### **c- Effets sur les monocytes/macrophages**

Les PLox activent les monocytes et induisent la sécrétion de chimiokines et cytokines dont l'IL-8, le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF $\alpha$ ), et l'IL-1 $\beta$  (Pegorier et al., 2006). De plus, la liaison des PLox au récepteur éboueur CD36 active des voies de signalisation pro-inflammatoires (Rahaman et al., 2006) et entraîne la génération de ROS par les macrophages (Park et al., 2009).

### **d- Effets sur la génération des ROS**

Les PAPCox peuvent augmenter la génération intracellulaire et extracellulaire de radicaux superoxydes au niveau des cellules endothéliales (Bochkov et al., 2010) par augmentation de l'activation de la NADPHox (Rouhanizadeh et al., 2005) ou découplage de la eNOS (Gharavi et al., 2006).

#### **e- Effets sur l'état de coagulation**

Les PLox induisent un état pro-coagulant au niveau de l'endothélium (Bochkov et al., 2010) par augmentation de l'expression et de l'activité du facteur tissulaire (Bochkov et al., 2002; Ohkura et al., 2004) et par inhibition de l'expression de la principale protéine anti-coagulante sur les CE, la thrombomoduline (Ishii et al., 2003). De plus, les PLox augmentent le risque de thrombose après l'activation des plaquettes, dont le CD36 figure parmi les récepteurs responsables (Podrez et al., 2007).

#### **f- Effets sur les cellules musculaires lisses vasculaires**

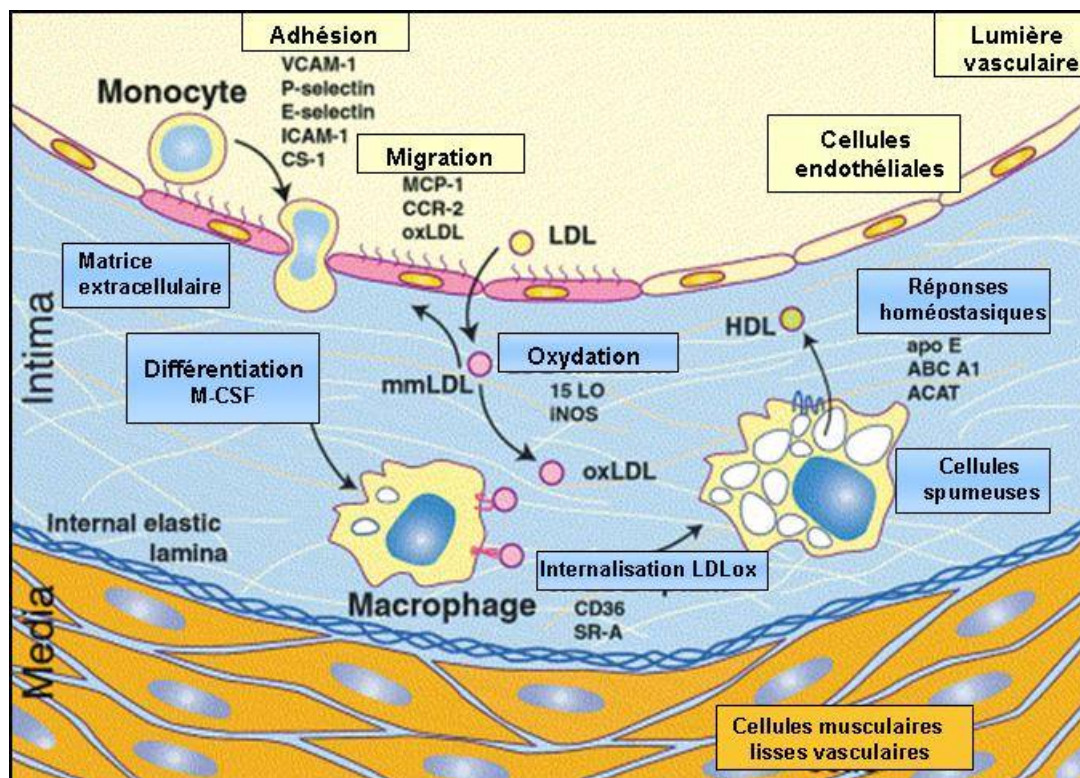
Les PAPCox réduisent l'expression de l'actine- $\alpha$  (Pidkovka et al., 2007), induisent l'expression du collagène de type VIII et stimulent la migration des CMLV (Cherepanova et al., 2009).

#### **g- Effets angiogéniques**

Les PLox stimulent la production endothéliale du VEGF-A, de l'IL-8, de prostaglandines dérivant de la voie de COX-2 et de la métalloprotéinase ADAMTS1 (*disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1*) (Bochkov et al., 2006). Ces facteurs activent la migration des CE, induisent la formation des bourgeonnements endothéliaux, stimulent l'angiogenèse et déstabilisent les plaques athérosclérotiques (Bochkov et al., 2010).

### **1.2.2. Recrutement des monocytes au niveau de l'espace sous-endothélial**

Les premières lésions caractéristiques de l'athérosclérose sont les stries lipidiques caractérisées par l'accumulation de cellules spumeuses d'origine essentiellement macrophagique. Ainsi, les cellules endothéliales activées expriment des molécules d'adhérence (sélectines-P et -E, VCAM-1, ICAM-1) et des cytokines (CCL-2) qui favorisent le recrutement des monocytes en circulation. Ces derniers traversent l'endothélium et se transforment dans l'intima en macrophages sous l'effet du M-CSF où ils lient les LDLox (Mestas and Ley, 2008). Les macrophages recrutés pour assurer la clairance des lipoprotéines oxydées internalisent ces dernières via les récepteurs éboueurs, dont principalement le récepteur CD36 (Endemann et al. 1993; Nicholson et al., 1995). Notons que l'expression du CD36 peut être augmentée au cours de la différenciation des monocytes en macrophages et suite à la stimulation par le LDLox (Tuomisto et al., 2005). En cas de surcharge en LDLox, les cellules accumulent des gouttelettes d'ester de cholestérol et se transforment en cellules spumeuses qui demeurent dans l'intima et constituent les premières lésions d'athérome (Figure 7).



**Figure 7. Recrutement des monocytes et développement des cellules spumeuses.**

Cette figure illustre les principales étapes conduisant à la formation des cellules spumeuses (figure traduite de Glass and Witztum, 2001) [Reprinted from *Cell*, 104(4), Glass CK, Witztum JL., *Atherosclerosis: The Road Ahead*, Pages 503-516, Copyright (2001), with permission from Elsevier].

Le recrutement des monocytes circulants au niveau de l'endothélium et leur passage dans l'espace sous-endothélial est une étape-clé dans le développement de l'athérosclérose. Chez les modèles expérimentaux, la déplétion des monocytes de la circulation réduit significativement la formation des lésions athérosclérotiques et altère profondément la composition de la plaque, avec une réduction du contenu en collagène et une diminution de la formation du noyau nécrotique (Stoneman et al., 2007). Le recrutement des monocytes au niveau du site inflammatoire est une succession de plusieurs étapes strictement régulées par un système de molécules d'adhérence et de

chimiokines. La migration dirigée des leucocytes est régulée par des signaux extracellulaires qui peuvent être solubles ou présentés à la surface cellulaire des cellules endothéliales ou au niveau de la matrice extracellulaire (Ley et al., 2007; Zernecke et al., 2008, Zernecke and Weber, 2005, Erkişson, 2004).

### **1.2.2.1. Roulement des monocytes**

#### **a- Rôle des sélectines**

Le roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire est médié par les sélectines-L, P et E (Ley et al., 2007). La sélectine-L est exprimée par la majorité des leucocytes alors que les sélectines-E et P sont exprimées par l'endothélium vasculaire activé et par les plaquettes (sélectine-P) (Ley et al., 2007). Les sélectines interagissent avec leurs contre-ligands qui sont des glycoprotéines exprimées au niveau des surfaces cellulaires, dont la mieux caractérisée est la *P-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL1) (Huo and Xia, 2009). La PGSL-1 est exprimée constitutivement sur tous les leucocytes et interagit avec les trois sélectines (Huo and Xia, 2009) pour permettre aux leucocytes de rouler sur l'endothélium activé (Ley et al., 2007; Luster et al., 2005; Yoshida et al., 1996). De plus, la liaison de PSGL1 à la sélectine-L favorise aussi les interactions leucocyte-leucocyte; ainsi les leucocytes adhérents facilitent la capture secondaire des leucocytes en circulation et permettent aux leucocytes qui n'expriment pas de ligands à la sélectine-P ou E d'atteindre les sites athérosclérotiques (Eriksson, et al. 2001) (Figure 8). La liaison aux sélectines active des voies de signalisation qui permettent aux cellules de rouler au contact de l'endothélium, telles que l'activation en aval de PGSL1 dans les cellules myéloïdes de la kinase SYK (*spleen tyrosine kinase*) (Zarbock et al., 2007) qui

stimule l'activation partielle de l'intégrine- $\beta_2$  LFA-1 (signalisation *inside-out*) conduisant au ralentissement des leucocytes en mouvement sur l'endothélium (Frommhold et al., 2007).

### **b-Rôle des intégrines**

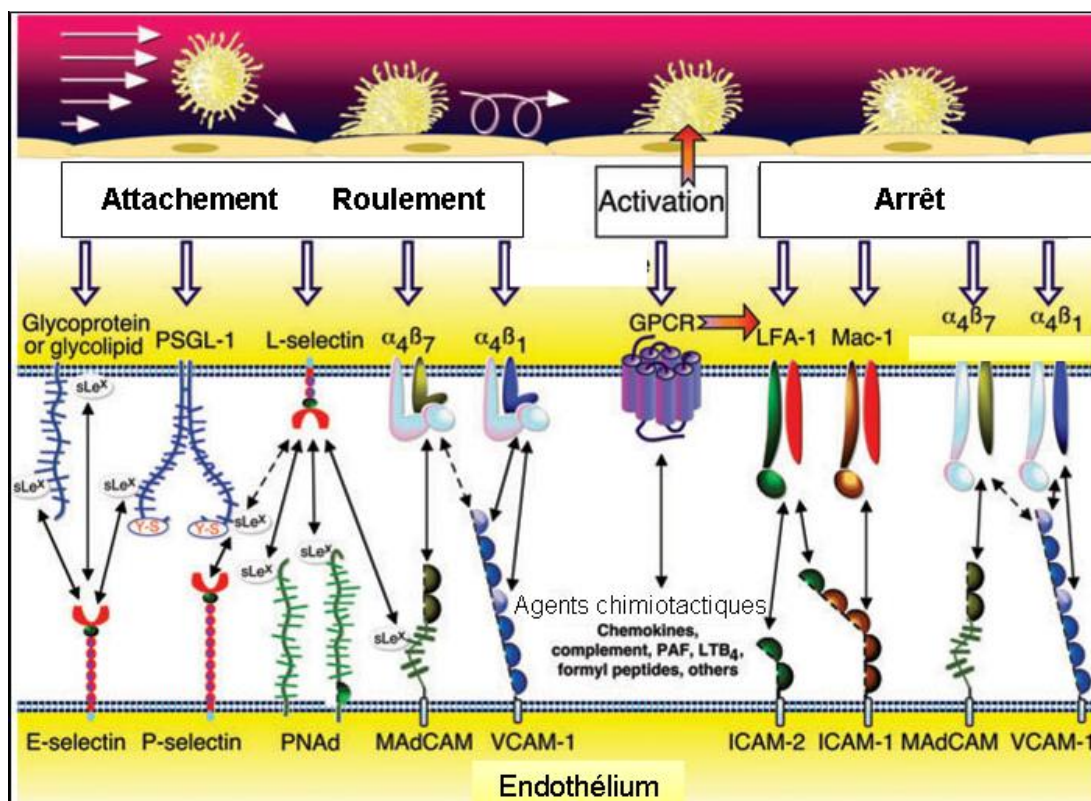
Différentes intégrines participent au roulement des leucocytes et médient l'adhésion ferme des cellules. L'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  (*very late antigen 4*, VLA4) permet le roulement des monocytes par liaison à VCAM-1 exprimé au niveau des cellules endothéliales activées (Huo et al., 2000). Les intégrines- $\beta_2$  telles que  $\alpha L\beta 2$  (*lymphocyte function-associated antigen 1*, LFA-1) (Salas et al., 2004) et  $\alpha M\beta 2$ -intégrine (*macrophage receptor 1*, MAC-1) (Dunne et al., 2002) peuvent également participer au roulement et à l'adhésion ferme des cellules (Ley et al., 2007). Ainsi, la liaison des leucocytes à la sélectine-E endothéliale active l'intégrine  $\alpha L\beta 2$  qui adopte alors une conformation de haute affinité lui permettant de lier l'ICAM-1 exprimée par les cellules endothéliales (Ley et al., 2007; Luster et al. 2005) (Figure 8).

#### **1.2.2.2. Activation et arrêt des monocytes**

L'arrêt des leucocytes au niveau endothélial est observé en présence des agents chimiotactiques et est médié par la liaison des intégrines des leucocytes aux molécules d'adhérence endothéliales (Campbell et al., 1996; Imhof and Aurrand-Lions, 2004). Les intégrines les plus impliquées dans l'arrêt des monocytes appartiennent aux familles des intégrines- $\beta 1$  et - $\beta 2$ , dont essentiellement l'intégrine- $\beta 1$  VLA4 et les intégrines- $\beta 2$  LFA-1 et MAC-1 (Ley et al., 2007). Au cours de l'athérosclérose, l'activation des cellules

endothéliales induit l'expression des molécules d'adhérence endothéliales de la superfamille des immunoglobulines, telles que VCAM-1, et stimule la synthèse des chimiokines et des lipides bioactifs chimiotactiques (Lusis, 2000). D'autres agents chimiotactiques peuvent être générés à partir des plaquettes ou des mastocytes (von Hundelshausen et al., 2005; Huo et al., 2003; von Hundelshausen et al., 2001) et peuvent être déposés au niveau de la surface apicale des cellules endothéliales pour diriger la migration des cellules par haptotaxie (Wiedermann et al., 1993). Au niveau des leucocytes, la liaison des chimiokines à leurs récepteurs couplés aux protéines G active des voies de signalisation intracellulaires qui provoquent i) un changement conformationnel de l'intégrine créant un site de liaison qui permet la liaison de l'intégrine aux molécules d'adhérence endothéliales; ii) une concentration des intégrines au niveau de la partie antérieure de la cellule en migration résultant en une polarisation cellulaire nécessaire pour la transmigration des leucocytes (Imhof and Aurrand-Lions, 2004; van Buul and Hordijk, 2004) (Figure 8).





**Figure 8. Ligands et contre-ligands impliqués dans les interactions leucocytes-cellules endothéliales et dans la migration des monocytes au niveau des lésions athérosclérotiques.** Cette figure montre les principales molécules d'adhérence régulant l'attachement, le roulement, l'activation et l'arrêt des monocytes sur l'endothélium inflammé (figure traduite de Luster et al., 2005) [Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Immunology* (Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets), copyright (2005); Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Immunology* (Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets), copyright (2005)].

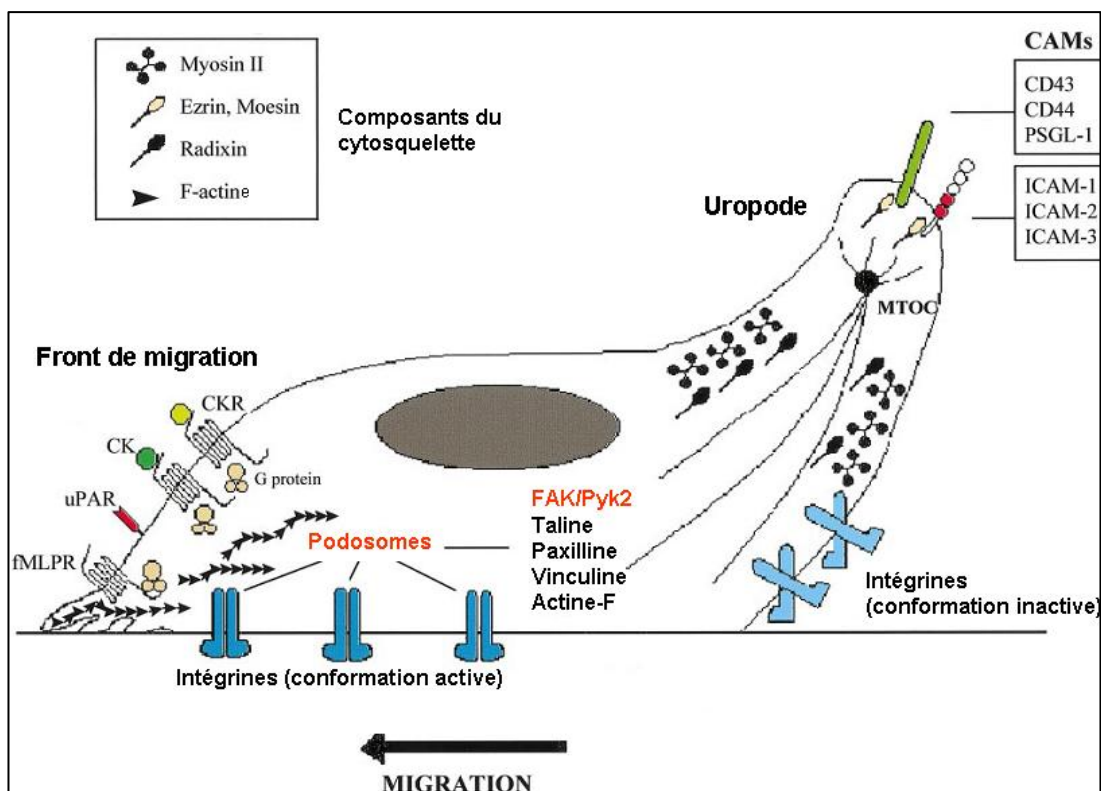
### 1.2.2.3. Migration transendothéliale

La transmigration à travers l'endothélium vasculaire est le dernier processus de la migration des leucocytes vers les sites athérosclérotiques. Avant de migrer à travers la paroi vasculaire, les leucocytes rampent à la surface de l'endothélium de façon

dépendante de MAC-1 et ICAM1 afin de repérer des sites préférentiels pour leur transmigration (Schenkel et al., 2004). La transmigration endothéliale peut se faire par différentes voies: i) la voie paracellulaire qui implique la rupture ou l'affaiblissement des jonctions exprimées entre les cellules endothéliales, telle que la liaison des cadherine VE. Cette voie est par contre facilitée par l'expression de la molécule d'adhérence PECAM-1 et possiblement celle d'autres molécules telles que la molécule de jonction cellulaire JAM-A (*junctional adhesion molecule A*) (Ley et al., 2007); ii) la voie transcellulaire, qui débute par l'extension de protrusions membranaires jusqu'aux cellules endothéliales, où la liaison des leucocytes à ICAM-1 déclenche la translocation de cette dernière à des régions membranaires riches en cavéoles et en actine. Les cavéoles contenant ICAM-1 s'associent entre elles pour former des organelles vésiculo-vacuolaires qui forment comme un canal à travers lequel les leucocytes peuvent migrer (Ley et al., 2007).

#### **1.2.2.4. Polarisation des leucocytes au cours de la migration**

La polarisation cellulaire est une caractéristique des leucocytes pendant leur migration. Deux compartiments s'établissent au niveau de la cellule: i) le côté frontal migrant (*leading edge*) qui forme des podosomes à l'intérieur desquels l'activation des divers éléments constitutants est nécessaire pour assurer la migration en direction du gradient chimiotactique, et ii) le côté caudal (uropode) dont la rétraction est nécessaire pour faire avancer la cellule (Sanchez-Madrid and del Pozo; 1999) (Figure 9).

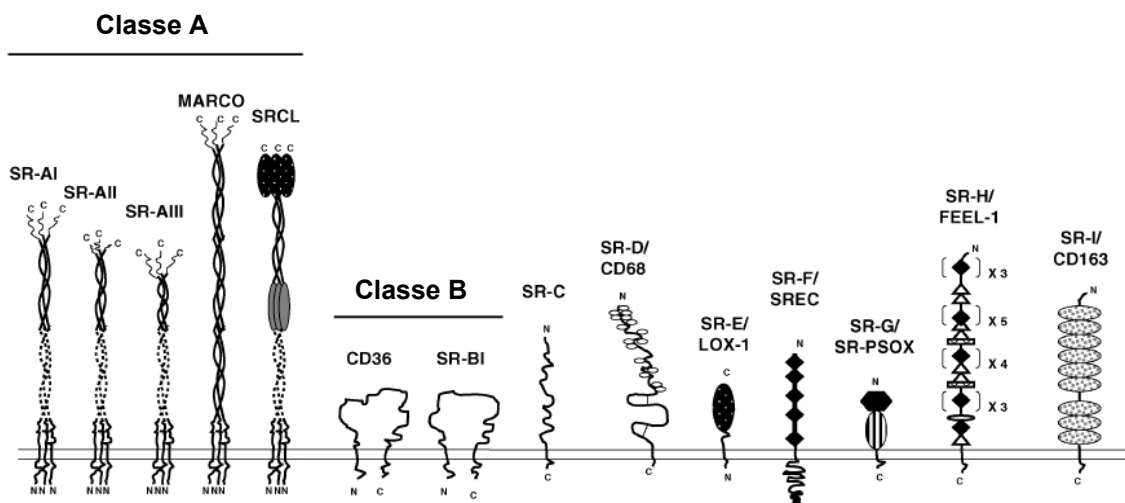


**Figure 9. Polarisation cellulaire, formation du front de migration, de l'uropode et migration.** Un équilibre entre la formation et la destruction des podosomes est nécessaire pour assurer la mobilité cellulaire (figure traduite de Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999) [Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *The EMBO Journal* (Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions), copyright (1999); Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: *The EMBO Journal* (Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions), copyright (1999)].

### 1.2.3. Internalisation des lipoprotéines modifiées par les macrophages: rôle des récepteurs éboueurs

Pour se transformer en cellules spumeuses, les macrophages internalisent les LDLox par phagocytose (Hurt et al., 1990), par internalisation des complexes immuns (LDLox-anticorps) (Toussaint, 2003), mais surtout par l'intermédiaire de récepteurs éboueurs (Shashkin et al., 2005).

La famille des récepteurs éboueurs (*Scavenger receptors, SR*) inclut huit sous-classes de récepteurs dont certains sont structuralement différents mais partagent entre eux différentes propriétés fonctionnelles (Greaves and Gordon, 2009) (Figure 10). Ces récepteurs sont capables de lier et d'internaliser un large spectre de ligands modifiés, incluant les cellules apoptotiques, les phospholipides anioniques, les protéines amyloïdes et certains composants des pathogènes (Moore and Freeman, 2006).



**Figure 10. Classification des récepteurs éboueurs.** Les récepteurs éboueurs sont classifiés selon leur structure en neuf différentes classes (figure traduite de van Berkel et al., 2005) [van Berkel et al., *Curr Opin Lipidol.* 2005; 16, 525-535, with permission of Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins].

Les récepteurs éboueurs sont des membres du groupe des récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*) qui médient la réponse immune innée à travers la reconnaissance de séquences moléculaires conservées chez les pathogènes et retrouvées au niveau des différents ligands qu'ils lient (Greaves and Gordon, 2005; van Berkel et al., 2005). Par exemple, il a été suggéré que les récepteurs éboueurs reconnaissent des néoantigènes endogènes, retrouvés au niveau des lipoprotéines oxydées, dont la structure moléculaire

ressemble à celle retrouvée chez les pathogènes (Greaves and Gordon, 2009). Il a aussi été suggéré que des mécanismes immunitaires semblables à ceux déclenchés en réponse aux pathogènes peuvent être responsables de l'internalisation des LDLox dans les macrophages et de l'activation d'une cascade inflammatoire caractéristique de l'athérosclérose (Moore and Freeman, 2006). Les récepteurs éboueurs sont beaucoup plus que de simples récepteurs qui internalisent des lipoprotéines au cours de l'athérosclérose; ce sont des récepteurs clés dans le déclenchement de nombreuses voies de signalisation qui régulent l'activation des macrophages, le métabolisme des lipides et la réponse inflammatoire associée à la progression des plaques athérosclérotiques (Greaves and Gordon, 2009; Moore and Freeman, 2006; van Berkel et al., 2005).

Le clonage du premier membre de la famille des récepteurs éboueurs, le SR-A a été reporté en 1990 et a été originalement nommé *macrophage scavenger receptor* (MSR). La famille de SRs de classe A s'est cependant élargie pour inclure deux autres membres qui partagent un domaine commun «*collagene-like*» et une structure hétérotrimérique: le récepteur MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*) et le récepteur SRCL (*scavenger receptor with C-type lectin*). Les récepteurs SR-AI et SR-AII sont exprimés au niveau des macrophages, incluant les cellules spumeuses dérivées des macrophages, et sont détectés au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires des plaques athérosclérotiques (Moore and Freeman, 2006). SR-AI et SR-AII sont responsables de la majorité (~80%) de l'internalisation du LDL acétylé par les macrophages, mais ils présentent une affinité plus faible pour le LDLox (Kunjathoor et al., 2002) et lient préférentiellement le LDL extensivement oxydé en reconnaissant l'apolipoprotéine B oxydée (apoB) (Lougheed et al., 1996).

L'implication du récepteur SR-A dans l'athérosclérose est conflictuelle (Kuchibhotla et al., 2008; Kunjathoor et al., 2002), et le récepteur est considéré proathérogène plutôt dans les étapes avancées de la pathologie (Moore and Freeman, 2006). La classe B des récepteurs éboueurs contient le récepteur CD36 ainsi que deux autres membres à structure similaire, SR-BI et le LIMP-II (*lysosomal integral membrane protein-II*). Bien que leurs structures soient similaires, les récepteurs CD36 et SR-BI jouent des rôles distincts dans le métabolisme du cholestérol et dans l'athérosclérose (Moore and Freeman, 2006). Le rôle du CD36 dans l'athérosclérose sera détaillé dans le chapitre 2 de la thèse; notons cependant que ce récepteur est reconnu dans la littérature comme un des récepteurs éboueurs les plus impliqués dans toutes les étapes du développement et de la progression de l'athérosclérose, contribuant jusqu'à 60% de l'accumulation du LDLox dans les macrophages (Silverstein and Febbraio, 2009; Febbraio and Silverstein, 2007; Guy et al., 2007; Febbraio et al., 2004; Febbraio et al., 2000). Les récepteurs SR-BI et SR-BII partagent ~30% d'homologie de structure avec le CD36, et comme ce dernier, ils peuvent lier les formes modifiées du LDL ainsi que la forme native des lipoprotéines (HDL, LDL et VLDL) (Greaves and Gordon, 2009). SR-BI est fortement exprimé au niveau du foie et des macrophages et joue un rôle majeur dans le métabolisme des lipoprotéines via plusieurs mécanismes dont: (1) la médiation du transfert du cholestérol des cellules vers le HDL; (2) le transfert sélectif du cholestérol de la particule HDL vers les tissus stéroïdogéniques et vers le foie et (3) l'internalisation sélective des esters de cholestérol au niveau du hépatocytes (Moore and Freeman, 2006). Le rôle du récepteur SR-BI dans l'athérosclérose a été évalué chez plusieurs modèles de souris et est généralement considéré comme anti-athérosclérotique (Braun et

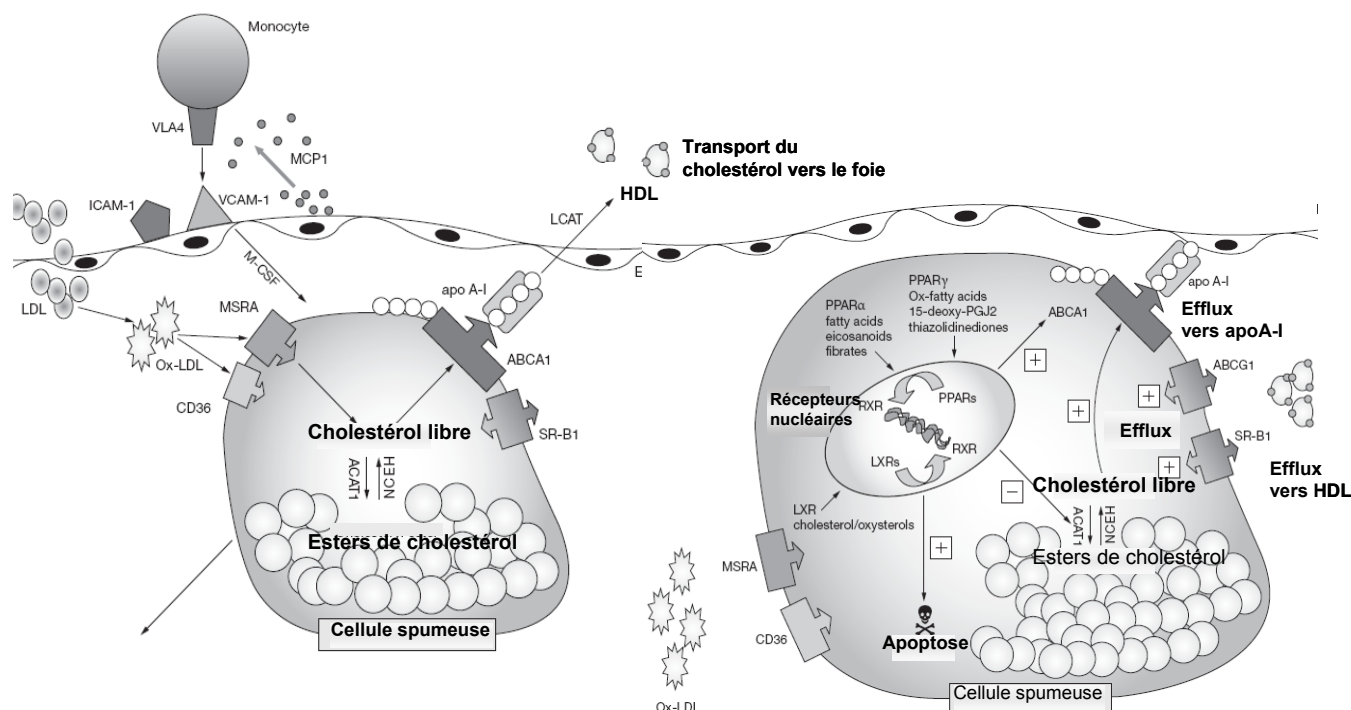
al., 2002; Covey et al., 2003). Le récepteur LOX-1 est un récepteur du LDLox au niveau des cellules endothéliales (Sawamura et al., 1997) ainsi qu'au niveau des macrophages et des cellules musculaires lisses vasculaires (Moore and Freeman, 2006), mais son rôle *in vivo* dans le développement de l'athérosclérose n'est pas encore élucidé (Greaves and Gordon, 2009).

### **1.2.3.1. Homéostasie du cholestérol**

Les macrophages internalisent de façon majeure et non contrôlée les LDL oxydées par l'intermédiaire des récepteurs éboueurs. Après leur internalisation, la majorité des lipoprotéines (tels que les LDLox, LDLagrégées) sont transportées au niveau du lysosome où elles sont digérées et dégradées (Takahashi et al., 2002). Dans le cytosol, le cholestérol libre est retenu dans le cycle des esters de cholestérol, avec estérification catalysée par l'ACAT (*acyl CoA:cholesterol acyltransferase*) et libération subséquente des esters de cholestérol catalysée par la NCEH (*neutral cholesterol ester hydrolase*). Le cholestérol libre sort de la cellule par diffusion passive et par efflux facilité (Shashkin et al., 2005; Choudhury et al., 2005) (Figure 11). L'efflux bidirectionnel du cholestérol peut se faire par diffusion passive (voie insuffisante) ou via le récepteur SR-BI (Ji et al., 1997). L'efflux unidirectionnel est médié par les transporteurs des stérols de la famille des ABC (*ATP-binding cassettes transporters*) (Yancey et al., 2003) qui interagissent avec des accepteurs du cholestérol, tels que l'apoA-I, le pre- $\beta$  HDL et le HDL, pour transporter le cholestérol au foie où il sera catabolisé (Chinetti-Gbaguidi et al., 2006).

Le transport inverse du cholestérol est largement régulé par les récepteurs nucléaires incluant le PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) ainsi que le LXR $\alpha$  (*liver X receptor  $\alpha$* ), qui régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol dans les macrophages (Tontonoz and Mangelsdorf, 2003; Tangirala et al., 2002; Chawla et al., 2001a; Chawla et al., 2001c; Tontonoz et al., 1998). L'endocytose et le catabolisme des LDLox permet la formation de ligands et activateurs du PPAR $\gamma$ , dont les acides hydroxy-octadécadiénoïque (HODE) 9-HODE et 13-HODE (métabolites oxydés de l'acide linoléique qui est un des composants du LDLox) (Nagy et al., 1998). L'activation de PPAR $\gamma$  augmente l'expression de SR-BI, ABCA1 et ABCG1 par le biais d'une induction de l'expression de LXR $\alpha$  (Tontonoz and Spiegelman, 2008; Chawla et al., 2001b; Tontonoz and Nagy, 1999). Par conséquent, l'activation de PPAR $\gamma$ /LXR $\alpha$  augmente l'efflux du cholestérol vers l'apoA-I (accepteur qui interagit avec ABCA1) et vers le pre $\beta$ -HDL (accepteur qui interagit avec ABCG1) (Ricote et al., 2004). Le LDLox active également sa propre internalisation (Rhaman et al., 2006) en conséquence d'une rétroaction positive de PPAR $\gamma$  sur l'expression membranaire du CD36 (Tontonoz et al., 1998) et de l'absence de rétrocontrôle négatif (Nicholson, 2004). Ainsi, la surcharge cellulaire en LDLox est largement contrôlée par le CD36 (Silverstein and Febbraio, 2000; Nicholson et al., 2000).





**Figure 11. Monocytes/Macrophages : éléments-clés dans le développement de l'athérosclérose.** Cette figure illustre le rôle des monocytes/macrophages dans l'homéostasie du cholestérol et dans la formation des cellules spumeuses (figure modifiée et traduite de Choudhury et al., 2005) [Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine (Mechanisms of Disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis)*, copyright (2005); Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine (Mechanisms of Disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis)*, copyright (2005)].

#### 1.2.4. Hétérogénéité des macrophages au niveau des lésions athérosclérotiques

De récentes publications font état du caractère versatile et plastique des macrophages, leur permettant d'adapter la réponse inflammatoire à leur environnement (Chinetti-Gbaguidi et al., 2007). Les macrophages se présentent au niveau des plaques athérosclérotiques sous forme de deux sous-populations différentes, les macrophages

M1 (nommés macrophages activés de façon classique) et les macrophages M2 (nommés macrophages activés de façon alternative) (Mantovani et al., 2009). Le LPS, l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), et les cytokines Th1 telles que l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) induisent le profil M1. Par contre, les cytokines Th2 telles que l'IL-4 et l'IL-13 activent le profil M2 (Mosser and Edwards, 2008; Mantovani et al., 2009). Les macrophages M1 sont des cellules effectrices qui produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, et l'IL-12. Par contre, les macrophages M2 présentent des propriétés anti-inflammatoires et produisent des facteurs tels que l'IL-10, l'antagoniste du récepteur IL-1 (IL-1Ra) et le TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ ) (Chinetti-Gbaguidi et al., 2007 ; Gordon and Taylor, 2005). Les macrophages M2 ont également des capacités de remodelage du tissu endommagé et sont impliqués dans l'angiogenèse (Shimada, 2009 ; Mosser and Edwards, 2008; Mantovani et al., 2004). Notons que le LDLox favorise la polarisation des macrophages en cellules M1 (Mantovani et al., 2009; Shimada, 2009) alors que l'activation de PPAR $\gamma$  favorise la différenciation des monocytes en macrophages M2 (Charo, 2007; Bouhlef et al., 2007). Au niveau vasculaire, les macrophages M1 sont retrouvés au sein des plaques lipidiques (Mantovani et al., 2009; Shimada, 2009) M2 (Charo, 2007) alors que les macrophages M2 sont localisés dans une zone distante du corps lipidique (Bouhlef et al., 2007). La présence des macrophages M1/M2 dans les lésions athérosclérotiques a permis de proposer que l'athérosclérose est non seulement la conséquence d'une réaction inflammatoire locale mais aussi le résultat d'une défaillance des mécanismes anti-inflammatoires de défense (défaillance de la phénoconversion du profil M1 en M2 des macrophages) (Shimada, 2009; Chinetti-Gbaguidi et al., 2007).

En conclusion, le recrutement des monocytes dans l'espace sous-endothélial et leur différenciation en macrophages est une étape-clé dans le développement de l'athérosclérose. L'internalisation du LDLox par les récepteurs éboueurs des macrophages est une étape critique dans la formation des cellules spumeuses. Parmi tous les récepteurs éboueurs, le récepteur CD36 est celui qui reconnaît et internalise les lipides oxydés le plus intensément.

## **Chapitre 2. Le récepteur CD36**

### **2.1. Structure du CD36**

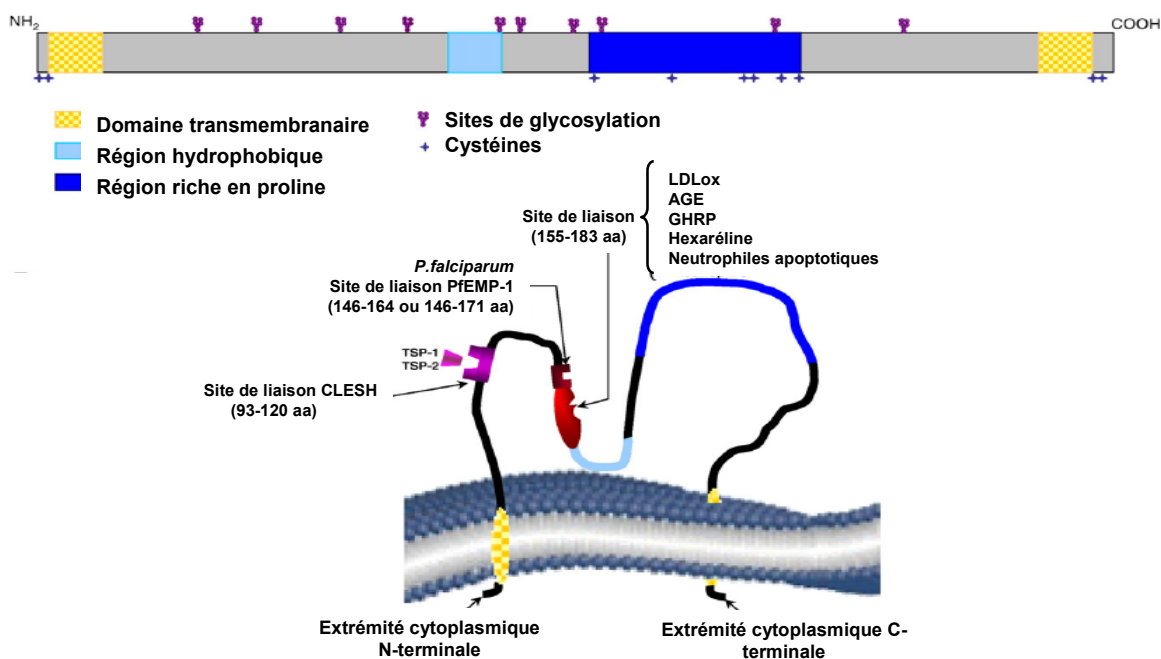
Le récepteur CD36 est une protéine transmembranaire ditopique fortement glycosylée ayant un poids moléculaire qui varie entre 78 et 90 kDa dépendamment du type cellulaire et de la glycosylation post-traductionnelle (Gruarin et al., 2000; Rac et al., 2007). Le gène humain du CD36 est localisé au niveau du chromosome 7q11.2, s'étendant sur 28 Kb (Fernandez-Ruiz et al., 1993; Wyler et al., 1993) et codant pour une protéine de 471 acides aminés dont le poids moléculaire estimé à 52922 Da (Silverstein and Febbraio, 2009). Cependant, le récepteur humain présente dix sites de glycosylation au niveau de son domaine extracellulaire faisant de sorte que son poids moléculaire réel est de ~ 80-90 kDa (Oquend et al., 1989). Des quinze exons qui sont présents au niveau du gène, seulement des parties de l'exon 3, 4 à 13 et des parties de l'exon 14 codent pour la protéine CD36. Les exons 1a, 1b, 1c, 1e et 1f ont été décrits comme des exons alternatifs qui sont régulés de façon différente selon le type cellulaire



Le domaine intracellulaire est formé de deux queues cytoplasmiques très courtes; les parties N-terminale (Gruarin et al., 2000) et C-terminale (Eyre et al., 2007) sont importantes pour l'activité du CD36. Les queues cytoplasmiques sont caractérisées par une paire de résidus cystéine palmitoylés, les cystéines 3 et 7 au niveau N-terminal, et les cystéines 464 et 466 au niveau C-terminal; cette palmitoylation est importante pour localiser le CD36 au niveau des cavéoles et des radeaux lipidiques (Jochen et al., 1993; Tao et al., 1996). Dans certains types cellulaires (tels que les adipocytes) la localisation du CD36 au niveau des radeaux lipidiques (Pohl et al., 2005) et l'expression de certaines protéines membranaires telles que cavéoline-1 (Ring et al., 2006; Frank et al., 2004) sont nécessaires pour la localisation membranaire du CD36 (Vistisen et al., 2004) et pour son activité cellulaire, telle que l'internalisation des acides gras (Ehehalt et al., 2008). Ce qui est notablement absent du domaine intracellulaire du CD36 est la présence de domaines spécifiques associés à des kinases ou à des protéines adaptatrices, ou de motifs qui spécifient les interactions du récepteur avec d'autres protéines (Febbraio and Silverstein, 2007). Au niveau de la partie C-terminale, les acides aminés 467-472 constituent un domaine fonctionnel nécessaire pour la liaison aux LDLox (Malaud et al., 2002). La partie C-terminale a été également impliquée dans l'internalisation des acides gras (Eyre et al., 2007). Le CD36 peut être ubiquitiné sur les résidus lysine 469 et 472 du domaine C-terminal (Smith et al., 2008).

Le domaine extracellulaire du CD36 est riche en sites de glycosylation (Collot-Teixeira et al., 2007). Cette partie du récepteur présente un domaine hydrophobique (région riche en proline localisée entre les acides aminés 242 à 333) qui peut potentiellement interagir avec la membrane plasmique (Collot-Teixeira et al., 2007) (Figure 13). Plusieurs

domaines fonctionnels ont été identifiés au niveau extracellulaire. Le domaine localisé entre les acides aminés 155 à 183 est reconnu comme un domaine de liaison du LDLox (Navazo et al., 1996), des produits de glycations avancés (AGEs) (Ohgami et al., 2001) et des peptides synthétiques dérivés de la famille des «*Growth Hormone Releasing Peptides*» (GHRPs) tels que l'hexaréline (Demers et al., 2004). Notons que le domaine contenant les acides aminés 155-183 (Navazo et al., 1996) et celui nommé CLESH (93-120) sont potentiellement impliqués dans l'endocytose des neutrophiles apoptotiques (Collot-Teixeira et al., 2007). Le domaine de liaison CLESH est également responsable de la liaison à la thrombospondine-1 (TSP-1) et TSP-2 (Dawson et al., 1997; Simantov et al., 2005; Collot-Teixeira et al., 2007). D'autres domaines présents au niveau du CD36, comme ceux au niveau des acides aminés 139-184, 146-164 ou 145-171 sont impliqués dans la liaison avec PfEMP-1, une protéine membranaire spécifiquement exprimée par les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (Collot-Teixeira et al., 2007). Une propriété intéressante du CD36 est la possibilité de phosphorylation de son ectodomaine au niveau du résidu thréonine 92 (Thr92) ce qui contrôle la liaison et l'affinité du récepteur à certains ligands (Asch et al., 1993; Hatmi et al., 1996), tels que *Plasmodium falciparum* (Ho et al., 2005).



**Figure 13. Représentation schématique de la protéine CD36** (figure traduite de Collot-Teixiera et al., 2007) [Reprinted from Collot-Teixeira et al., *Cardiovasc Res.* 2007. 75 (3):468-77, by permission of Oxford University Press].

## 2.2. Expression du récepteur CD36

Différents types cellulaires et tissulaires expriment le récepteur CD36 dont :

- les phagocytes: monocytes / macrophages (Endemann et al., 1993; Huh et al., 1995; Huh, et al., 1996), microglies (Coraci et al., 2002), cellules dendritiques (Rouabhia et al., 1994; Albert et al., 1998), épithélium pigmentaire de la rétine (Ryeom et al., 1996)
- les cellules endothéliales de la microvasculature (Swerlick et al., 1992)
- les plaquettes (Tandon et al., 1989)
- les adipocytes (Abumrad et al., 1993)
- les myocytes cardiaque et squelettique (Van Nieuwenhoven et al., 1995)
- les kératinocytes (Allen et al., 1991)

- l'épithélium des seins (Cleazardin et al., 1993), des intestins (Chen et al., 2001a) et des reins (Susztak et al., 2005)
- les cellules musculaires lisses vasculaires activées (Lim et al., 2006; de Oliveira et al., 2008)
- les hépatocytes activés (Yu et al., 2001; Zhou et al., 2006)

### **2.3. Régulation de l'expression du CD36**

La régulation de l'expression du CD36 peut se faire aussi bien au niveau transcriptionnel, traductionnel que post-traductionnel (Rac et al., 2007).

#### **2.3.1. Facteurs qui augmentent l'expression du CD36**

Parmi les facteurs qui augmentent l'expression cellulaire du CD36, mentionnons:

- l'adhérence endothéliale des monocytes sanguins (Huh et al., 1995; Prieto et al., 1994);
- la stimulation des monocytes par le facteur de croissance hématopoïétique de la lignée monocyttaire (M-CSF) (Yesner et al., 1996);
- la différenciation des monocytes en macrophages (Huh et al., 1996);
- l'endocytose du LDLox au niveau des macrophages (Nagy et al., 1998);
- le glucose (Chen et al., 2006; Farhangkhoe et al. 2005; Griffin et al., 2001) et l'insuline (Chabowski et al., 2004) au niveau des monocytes en circulation (Sampson et al., 2003), des macrophages au niveau des lésions athérosclérotiques (Griffin et al.,



2001), des intestins, du tissu adipeux, du cœur (Chen et al., 2006), des cellules endothéliales de la microvasculature (Farhangkhoei et al., 2005),;

- la stimulation par l'interleukine-4 (IL-4) générée par l'activation des voies de signalisation impliquant la 12 et 15 lipoxygénase (Huang et al., 1999), la protéine kinase C ou le PPAR $\gamma$  au niveau des macrophages (Feng et al., 2000)
- les activateurs synthétiques du PPAR $\gamma$  tels que les thiazolidinediones au niveau des monocytes/macrophages (Hirakata et al., 2004; Llaverias et al., 2006; Chen et al., 2001b), des adipocytes (Kolak et al., 2007) et du muscle squelettique (Wilmsen et al., 2003).

### **2.3.2. Facteurs qui diminuent l'expression du CD36**

Parmi les facteurs qui diminuent l'expression du CD36, mentionnons:

- les facteurs TGF- $\beta$ 1/2, via l'activation d'une MAPK qui induit la phosphorylation de PPAR $\gamma$  et inhibe sa transcription (Han et al., 2000);
- l'IL-10, sécrétée en réponse à l'interaction du CD36 avec les cellules apoptotiques (Rubic and Lorenz, 2006)
- les lipoprotéines de haute densité (*high-density lipoprotein*, HDL), possiblement en conséquence de l'induction de la phosphorylation de PPAR $\gamma$  en aval des MAPK (Nicholson, 2004)
- les statines au niveau des macrophages (Han et al., 2004; Bruni et al., 2005; Puccetti et al., 2005), bien que certaines données sont conflictuelles (Ye et al., 2007).

### 2.3.3. Trafic vésiculaire et ubiquitination du CD36

Un autre moyen de moduler de l'expression membranaire du CD36 est la régulation du trafic vésiculaire (Febbraio and Silverstein, 2007). En effet, l'existence de réservoirs intracellulaires de CD36 a été documentée dans les monocytes/macrophages (Huh et al., 1996) et dans les myocytes cardiaques et squelettiques (Luiken et al., 2002a; Luiken et al., 2002b). L'ubiquitination du CD36 et sa dégradation subséquente peuvent réguler les niveaux d'expression membranaire et intracellulaire du CD36 (Su and Abumrad, 2009). L'ubiquitination est inhibée par l'insuline alors qu'elle est augmentée par les acides gras (Smith et al., 2008). Dans le contexte physiopathologique lié à l'obésité ou à la résistance à l'insuline, le cycle de recyclage du CD36 entre la membrane plasmique et les pools intracellulaires est complètement dérégulé de sorte que le CD36 est relocalisé à la membrane plasmique des myocytes de façon permanente (Bonen et al., 2004; Coort et al., 2004). De plus, il a été rapporté que la résistance à l'insuline est associée à une ubiquitination anormalement diminuée du CD36 (Su and Abumrad, 2009), pouvant s'accompagner d'une augmentation de l'expression membranaire du CD36 au niveau des macrophages (Liang et al., 2004).

### 2.4. Fonctions du récepteur CD36

Le CD36 présente essentiellement deux fonctions selon le type cellulaire qui l'exprime: celle d'un récepteur «*scavenger*» et celle d'une translocase d'acides gras à longues chaînes (Silverstein and Febbraio, 2009). Au cours des dix dernières années, le rôle du CD36 a été décrit dans la physiopathologie cardiovasculaire (Kuang et al., 2004; Febbraio et al., 2000), le métabolisme lipidique (Koonen et al., 2005), le diabète

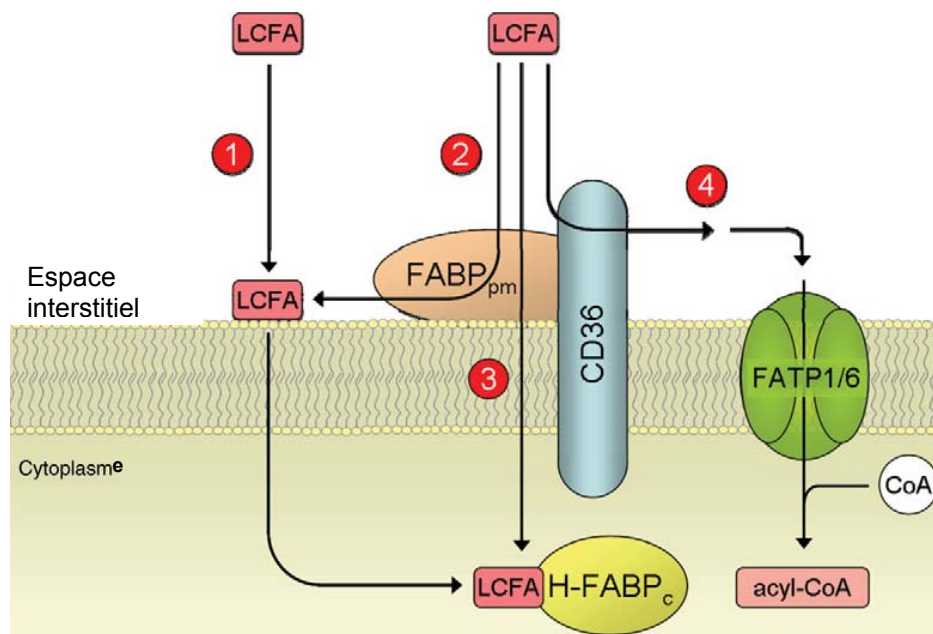
(Corpeleijn, 2006; Lepretre et al., 2004a; Lepretre et al., 2004b), l'angiogenèse (Simantov et al., 2005), la biologie du cancer (Huang et al., 2004), l'ischémie cérébrale (Cho et al., 2005), la maladie d'Alzheimer (Moore et al., 2002), la dégénérescence maculaire (Mwaikambo et al., 2006; Mwaikambo et al., 2008), la parasitologie (Franke-Fayard et al., 2005), la biologie des plaquettes (Englyst et al., 2003), et même dans la détection orosensorielle des lipides et le choix préférentiel des aliments (Laugerette et al., 2005). Pour des raisons de concision, nous mentionnerons brièvement certains de ces rôles, et nous détaillerons les voies de signalisation connues du CD36 en lien avec son implication dans l'athérosclérose.

#### **2.4.1. Fonction de récepteur éboueur (*scavenger*)**

Le CD36 est un récepteur primitif qui a évolué avec le système immunitaire afin de reconnaître les agents exogènes et aider l'organisme à les éliminer (Silverstein and Febbraio, 2009). Le CD36 reconnaît des composantes de la paroi de certains pathogènes bactériens (Hoebe et al., 2005; Philips et al., 2005; Triantafilou et al., 2006) et fongiques (Means et al., 2009) et des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (Smith et al., 2003) et active une cascade d'événements qui résulte en la phagocytose de ces agents (Smith et al., 2003). Le CD36 reconnaît et active l'internalisation cellulaire de ligands endogènes modifiés tels que les segments extérieurs oxydés des photorécepteurs de la rétine (Ryeom et al., 1996), les lipoprotéines oxydées (Endemann et al., 1993; Podrez et al., 2000), les produits terminaux de glycation (AGEs) (Ohgami et al., 2001; Basta et al., 2004), les cellules apoptotiques (Savill et al., 1992; Albert et al., 1998) et les peptides amyloïdes (Bamberger et al., 2003; El Khoury et al., 2003; Medeiros et al., 2004).

### 2.4.2. Fonction translocase des acides gras (FAT/CD36)

Le CD36 reconnaît les acides gras à longue chaîne (*long chain fatty acid*, LCFA) et facilite leur transfert à travers la membrane plasmique des adipocytes (Abumrad et al., 1993) et des myocytes des muscles squelettique et cardiaque (Koonen et al., 2005) (Figure 14). Au niveau du cœur et du muscle, l'oxydation des LCFA permet d'assurer la majorité de l'énergie nécessaire pour le fonctionnement cellulaire (Brinkmann et al., 2002). Au niveau du muscle squelettique (Bonen et al., 1999; Bonen et al., 2000) et cardiaque (Luiken et al., 2001), la contraction musculaire s'accompagne par une augmentation de l'expression membranaire de FAT/CD36 (Luiken et al., 2003) ainsi que de l'internalisation et de l'oxydation des LCFA. L'insuline induit des effets similaires au niveau des myocytes cardiaque et musculaire (Dyck et al., 2001; Luiken et al., 2002b). Différentes voies de signalisation ont été impliquées dans la translocation membranaire de FAT/CD36 à partir des réservoirs intracellulaires dont l'activation de la PI3 kinase par l'IRS-1 (*insulin receptor substrate family 1*) en aval du récepteur à l'insuline (Luiken et al., 2002a), l'activation de la p38 MAPK $\alpha/\beta$  en réponse à l'insuline et à l'exercice physique (Koonen et al., 2005) et l'activation de l'AMPK (*adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase*) en réponse à la contraction (Luiken et al., 2003) ou à l'ischémie cardiaque (Dolinsky and Dyck, 2006).



**Figure 14. Fonction translocase du CD36 et transfert des acides gras à longue chaîne.** Outre la diffusion passive (1), il est possible que le FAT/CD36, seul, ou en collaboration avec d'autres protéines de transport membranaire concentre les LCFA au niveau de la surface cellulaire afin d'augmenter leur transport membranaire (2), ou que le CD36 transporte activement les LCFA (3). Il est aussi possible que le CD36 et/ou FABPpm (*plasma membrane-associated fatty acid-binding protein*) agissent comme des récepteurs pour les LCFA, et les lient afin de les amener à proximité des autres FATP, telles que FATP1 et FATP6 (figure traduite de Schwenk et al., 2008) [Reprinted from Schwenk et al., 2008, *Cardiovasc Res.* 2008. 79: 249-258, by permission of Oxford University Press].

En plus d'être exprimé au niveau de la surface cellulaire et des pools intracellulaires, le CD36 est exprimé au niveau de la paroi mitochondriale des myocytes cardiaque et squelettique où il interagit avec la carnitine palmitoyltransférase I (CPT-I) afin de réguler le transport mitochondrial des acides gras et activer leur oxydation (Campbell et al., 2004; Schenk et al., 2006). Le contenu mitochondrial en CD36 est augmenté avec l'exercice (Schenk et al., 2006) et corrèle avec la capacité d'oxydation mitochondriale

des acides gras dans le muscle squelettique (Holloway et al., 2006; Holloway et al., 2007; Holloway et al., 2009).

L'expression du FAT/CD36 n'est pas détectée au niveau des pré-adipocytes mais elle augmente significativement avec la différenciation des cellules en adipocytes (Abumrad et al., 1993). Il a été suggéré que l'expression du CD36 au niveau du tissu adipeux est associée à l'obésité et au développement de la résistance à l'insuline (Fan et al., 2003).

## **2.5. Signalisation cellulaire en aval du CD36**

Bien que le CD36 possède un court domaine intracellulaire, qu'il soit dépourvu d'une activité intrinsèque kinase ou phosphatase et qu'il ne possède aucun lien direct avec des GTPases, le récepteur active différentes voies de signalisation dont un point commun est l'activation des kinases de la famille Src (Huang et al., 1991). Certains suggèrent que la signalisation en aval du CD36 est liée à la localisation du récepteur au niveau des radeaux lipidiques (Pohl et al., 2005; Zeng et al., 2003) où certaines des molécules de signalisation se trouvent concentrées, telles que les kinases Src (Silverstein and Febbraio, 2009). D'autres proposent que la signalisation par le CD36 se fait après son interaction avec d'autres récepteurs membranaires (ou co-récepteurs), tels que les intégrines (Bamberger et al., 2003; Miao et al., 2001; Savill et al., 1992; Albert et al., 1998) et les récepteurs TLR (*Toll-Like receptors*) (Hoebe et al., 2005; Triantafilou et al., 2006). Néanmoins, certaines études ont montré que le domaine cytoplasmique C-terminal est suffisant pour diriger l'assemblage des complexes de signalisation impliqués dans la médiation des fonctions cellulaires du CD36 (Stuart et al., 2005; Rahaman et al., 2006). Cependant, il a été montré que les TLRs ne sont pas requis pour

l'internalisation du LDLox (Rahaman et al., 2006) ou pour la phagocytose des cellules apoptotiques (Silverstein and Febbraio, 2009).

### 2.5.1. Cellules endothéliales

Le récepteur CD36 a été initialement identifié comme un récepteur responsable des effets anti-angiogéniques de la thrombospondine 1 (Kieffer et al., 1988; Dawson et al., 1997). Au niveau des cellules endothéliales, la liaison du domaine TSR «*Type I Repeat*» de TSP-1 (Iruela-Arispe et al., 1999) au CD36 active la kinase Fyn et l'association de cette dernière au domaine intra-cytoplasmique C-terminal du CD36 (Silverstein and Febbraio, 2009). Ceci conduit à l'activation des caspases et de la MAP kinase p38, déclenchant ainsi l'apoptose des cellules endothéliales (Jimenez et al., 2000; Simantov et al., 2003). L'interaction CD36-TSP1 inhibe la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF-A<sub>165</sub> (*vascular endothelial growth factor A<sub>165</sub>*) ainsi que l'angiogenèse *in vitro*, et provoque la diminution de l'expression du récepteur VEGF-R2 (Primo et al., 2005) (Figure 15A). Au niveau des capillaires de la rétine, la liaison de la TSP1 au CD36 inhibe l'activation de la kinase Akt et antagonise les signaux de survie activés par le VEGF- A<sub>165</sub> (Sun et al., 2009).

L'effet anti-angiogénique dépendant du CD36 est également observé avec d'autres ligands du CD36 tels que le LDLox (Chen et al., 1997; Imanishi et al., 2003). Ainsi, l'augmentation de l'expression du CD36 (Huang et al., 2004) ou l'activation des voies de signalisation en aval du CD36 par des phospholipides oxydés (PLox) (Mwaikambo et al., 2006) ou par des peptides mimétiques de la TSP-1 (Gietema et al., 2006) ont été proposés comme une avenue thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer

(Rusk et al., 2006) et de la néovascularisation inflammatoire de la cornée (Mwaikambo et al., 2008). Notons cependant que dans le cas de l'athérosclérose coronarienne, l'activation par le LDLox des voies anti-angiogéniques dépendantes du CD36 est délétère, du fait qu'elle retarde l'artériogénèse au niveau du myocarde (Tirziu et al., 2005), accélérant ainsi l'infarctus du myocarde (van Weel et al., 2006; Febbraio and Silverstein, 2007).

### **2.5.2. Phagocytes**

Au niveau des macrophages et des cellules dendritiques, l'expression du CD36 est nécessaire pour le déclenchement de la réponse immunitaire via les récepteurs TLR2/6 en réponse à des bactéries gram positive. Les hétérodimères TLR2/6 existent déjà préformés au niveau de la membrane plasmique mais leur association avec le CD36 est dépendante du ligand (Triantafilou et al., 2006). Le complexe nouvellement formé (CD36/TLR2/6) est recruté au niveau des radeaux lipidiques où la signalisation cellulaire est déclenchée, avec activation de NF- $\kappa$ B et sécrétion de TNF $\alpha$ , de l'IL-6 et de l'IL-12 (Hoebe et al., 2005). Notons cependant qu'en réponse à des bactéries gram négatives telles que *Escherichia coli*, ou à des composantes de leur paroi bactérienne telles que le LPS, l'induction de la réponse inflammatoire est indépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B par les TLRs. La phagocytose de ces bactéries nécessite principalement l'activation de la signalisation dépendante du CD36 qui amène à l'activation de la kinase *c-Jun N-terminal* (JNK) (Nilsen et al., 2008; Baranova et al., 2008).



### 2.5.3. Microglies

La liaison de la  $\beta$ -amyloïde au CD36 conduit à l'assemblage d'un complexe de signalisation incluant l'intégrine  $\alpha 6\beta 1$ , le CD47, les kinases Src Fyn et Lyn, la protéine adaptatrice p130Cas (*Cas*) et la kinase Pyk2 des complexes focaux d'adhésion, ainsi que la protéine adaptatrice du cytosquelette, la paxilline (*Pax*) (Stuart et al., 2007). Ce complexe de signalisation amène d'une part à la polymérisation de l'actine-F, et d'autre part à la phosphorylation de la p44/42 MAP kinase. Cette dernière augmente l'expression de cytokines pro-inflammatoires et chimiotactiques dont le TNF- $\alpha$ , le CCL-2, les MIP-1 et-2, l'IL-1 $\beta$ , ainsi que la formation de ROS (Moore et al., 2002; Stuart et al., 2007). Notons que les protéines amyloïdes fibrillaires retrouvées au niveau des plaques athérosclérotiques peuvent activer, chez les macrophages, une voie de signalisation dépendante du CD36 similaire à celle décrite chez les microglies, impliquant Lyn et p44/42 MAPK et conduisant à la sécrétion de TNF $\alpha$  et à la formation de ROS au sein des plaques (Stewart et al., 2005).

### 2.5.4. Macrophages

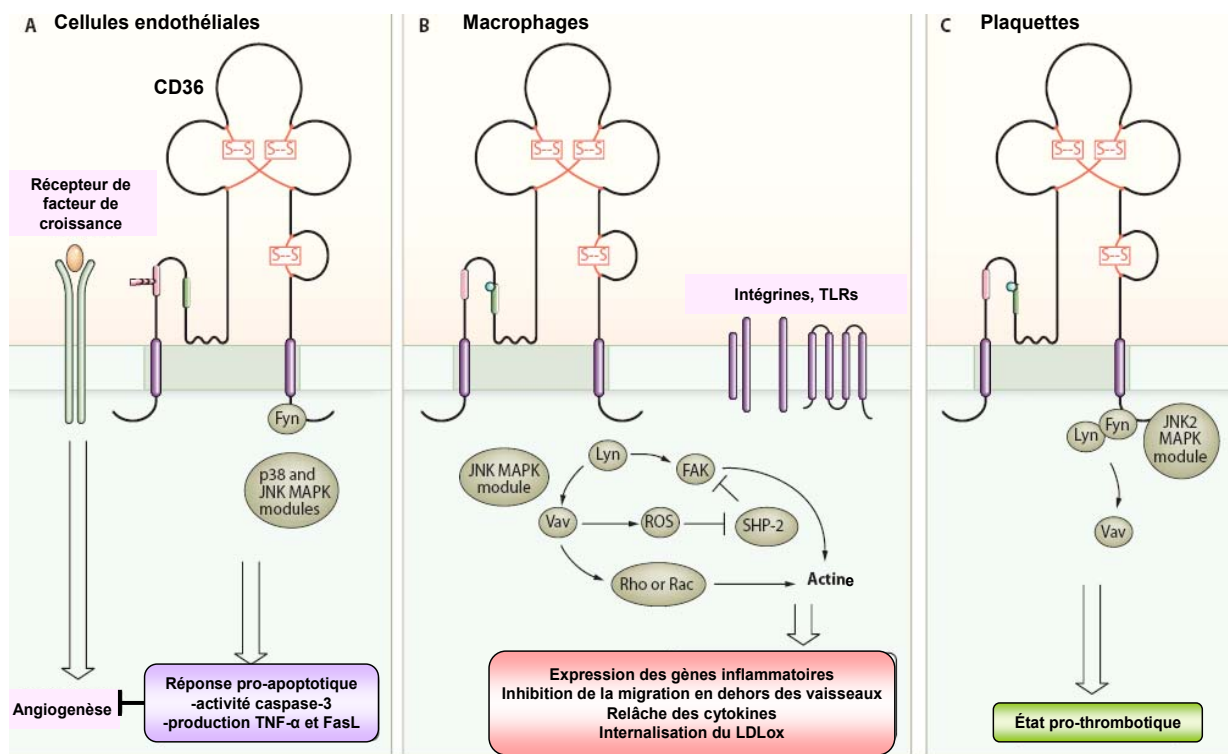
L'interaction du LDLox avec le CD36 active la kinase Src Lyn ainsi que les kinases MEKK2 et JNK2 (Rahaman et al., 2006). La signalisation via JNK2 est impliquée dans le remodelage du cytosquelette des macrophages, l'activation de la réponse inflammatoire, l'apoptose et la résistance à l'insuline (Kyriakis et al., 2001). De plus, la voie JNK2 est nécessaire pour la formation des cellules spumeuses de manière dépendante du CD36 (Rahaman et al., 2006). Ainsi le LDLox, le NO<sub>2</sub>-LDL et les phospholipides oxydés qui en dérivent (NO<sub>2</sub>-PAPC) activent, via le CD36, une voie de

signalisation qui permet leur propre internalisation. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de JNK2 réduit drastiquement l'accumulation des lipides dans les macrophages de manière dépendante du CD36, tel que démontré dans les cellules CD36<sup>-/-</sup> (Rahaman et al., 2006). De plus, l'incubation des macrophages en présence de LDLox altère la dynamique du cytosquelette pour augmenter l'étalement des macrophages. Cet effet est lié à l'activation de la NADPHox et à la génération intracellulaire des ROS. Ces derniers oxydent les résidus cystéine du site enzymatique de la phosphatase SHP2 provoquant de la sorte l'activation prolongée de la kinase FAK des complexes focaux d'adhésion, résultant en une augmentation de la polymérisation d'actine (Park et al., 2009). Le LDLox entraîne la transactivation de NF-κB (Han et al., 2000) par des mécanismes qui impliquent l'extrémité cytoplasmique C-terminale du CD36 (Lipsky et al., 1997) et active la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNFα/β, l'IL-1β, l'IL-6 et l'interféron (IFNβ/γ) de façon dépendante du CD36 (Janabi et al., 2000) (Figure 15B). Le LDLox induit l'apoptose des monocytes/macrophages via un mécanisme dépendant du CD36 qui entraîne l'activation de la caspase-3 (Wintergerst et al., 2000).

### 2.5.5. Plaquettes

Au niveau des plaquettes, le LDLox entraîne le recrutement et l'activation des kinases Src Fyn et Lyn, suivi de l'activation de MKK4 en amont de JNK2 de façon dépendante du CD36. Cette voie de signalisation entraîne l'activation des plaquettes et stimule leur agrégation et leur adhésion (Chen et al., 2008) (Figure 15C). *In vivo*, les plaquettes présentent une phosphorylation basale de JNK, dépendante du CD36,

associée à l'hyperlipidémie. Cette observation est illustrée par le fait que les plaquettes isolées de souris sauvages ou apoE<sup>-/-</sup> nourries avec une diète normale montrent un niveau minimal de phosphorylation de JNK2, tandis que les plaquettes de souris apoE<sup>-/-</sup> nourries avec une diète riche en lipides et en cholestérol montrent une phosphorylation basale importante de JNK2 qui est complètement absente au niveau des plaquettes déficientes en CD36. De plus, l'activation de JNK favorise le développement de thrombus *in vivo* (Chen et al, 2008). À l'appui de cette observation, l'interaction des plaquettes avec les PLox entraîne l'activation de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (*platelet fibrinogen receptor integrin*) et augmente sa liaison au fibrinogène et l'agrégation plaquettaire et induit l'expression de la sélectine-P de manière dépendante du CD36 (Podrez et al., 2007). Korporaal et al. ont montré qu'en réponse au LDLox, le CD36, conjointement avec le SR-A, induit l'activation de la MAP kinase p38 ce qui active les plaquettes et augmente leur capacité d'adhésion au fibrinogène (Korporaal et al., 2007).



**Figure 15. Voies de signalisation en aval du CD36** (figure modifiée et traduite de Silverstein and Febbraio, 2009) [From Silverstein and Febbraio. *Sci Signal*. 2009. 26;2(72):re3. Reprinted with permission from AAAS] [This translation is not an official translation by AAAS staff, nor is it endorsed by AAAS as accurate. In crucial matters, please refer to the official English-language version originally published by AAAS].

## 2.6. Rôle du récepteur CD36 dans l'athérosclérose

Les premières observations impliquant un rôle du CD36 dans le développement de l'athérosclérose résultent des travaux d'Endemann et al. (1993) qui ont montré que la transfection de la lignée cellulaire épithéliale rénale humaine (HEK293) avec le gène humain du CD36 (hCD36) s'accompagne d'une augmentation de la liaison, de l'internalisation et de la dégradation du LDLox par les cellules transfectées (Endemann et al., 1993). L'utilisation de l'anticorps anti-CD36 (OKM5) bloque presque complètement l'association des cellules transfectées avec le hCD36 au LDLox. Cette

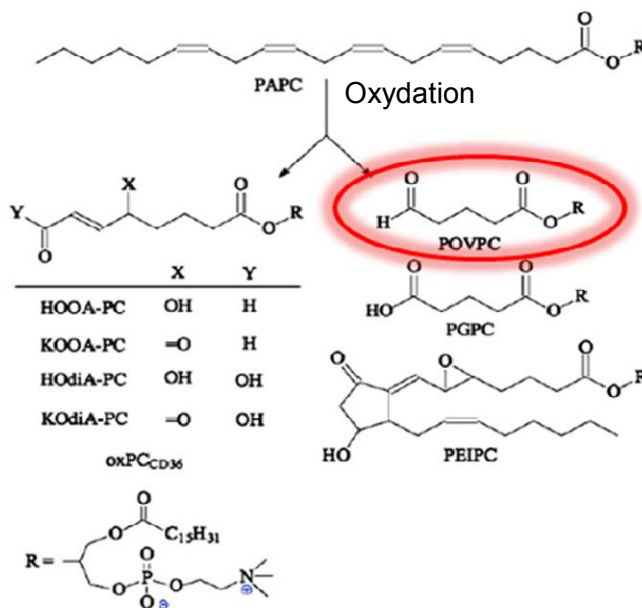
observation a été également reproduite au niveau des cellules exprimant normalement le CD36. En particulier, l'OKM5 bloque par plus de 52 et 54% la liaison du LDLox aux macrophages et plaquettes, respectivement (Endemann et al., 1993). Le LDLox active sa propre internalisation en augmentant l'expression du CD36. Ainsi, en plus de conduire à l'internalisation de ligands activateurs du PPAR $\gamma$  (9/13 HODE) (Nagy et al., 1998), l'internalisation du LDLox s'accompagne par l'activation de la p38 MAPK qui peut être suffisante pour la transactivation du PPAR $\gamma$  au niveau des macrophages et pour réguler à la hausse l'expression du CD36 (Zhao et al., 2002). Il est intéressant de mentionner que l'activation de PPAR $\gamma$  au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires induit l'expression du CD36 pouvant être impliqué dans l'internalisation du LDLox et la formation de cellules spumeuses d'origine musculaire (Lim et al., 2006).

Le rôle crucial du CD36 dans la formation et la progression de l'athérosclérose est appuyé en partie par les observations qui montrent que les plaques athérosclérotiques sont enrichies en ligands de haute affinité envers le CD36, tels que le LDLox (Podrez et al, 2002a) et les phospholipides (PL) oxydés (Plox) (Leitinger, 2003) qui sont absents au niveau des régions non athérosclérotiques (Ashraf et al. 2009). Les études de Podrez et al. ont permis d'identifier le NO<sub>2</sub>-LDL comme un ligand de haute affinité du CD36. *In vitro*, les NO<sub>2</sub>-LDL sont fortement athérogènes, et sont internalisées par les macrophages par une voie dépendante du CD36 qui conduit à la formation des cellules spumeuses (Podrez et al., 2000). Il a été suggéré que la NO<sub>2</sub>-LDL pourrait être formée *in vivo* en conséquence de la génération des espèces nitrosylées par le système de myéloperoxydase des monocytes (Podrez et al., 2000). L'importance de ce type de modification est appuyée par les données épidémiologiques liant les niveaux élevés de

MPO et de nitrotyrosine en circulation avec l'athérosclérose (Nicholls and Hazen, 2009). Kunjathoor et al (2002) ont montré que, comparés aux macrophages murins de type sauvage, les macrophages déficients en CD36 montrent une diminution de l'ordre de 90% de la liaison du LDL minimalement oxydé et une réduction de 68% de sa dégradation intracellulaire. Le degré d'oxydation du LDL n'influence pas sa liaison au CD36 mais il influence son internalisation via le CD36, avec les formes les plus oxydées du LDLox étant internalisées essentiellement via le récepteur éboueur SR-A. Les macrophages CD36<sup>-/-</sup> incubés pendant 48 heures avec du LDLoxmm montrent une diminution drastique de l'accumulation intracellulaire des esters de cholestérol (Kunjathoor et al., 2002) par comparaison aux cellules exprimant le CD36. Chez l'homme, les macrophages dérivés des monocytes isolés des sujets déficients en CD36 montrent une réduction de plus de 40% de l'accumulation intracellulaire des esters de cholestérol par rapport aux macrophages de sujets normaux (Nozaki et al., 1995).

Podrez et al. (2000) ont rapporté que le site de reconnaissance du LDL-NO<sub>2</sub> par les macrophages est principalement constitué par la partie lipidique de la lipoprotéine, avec plus de 90% de la liaison étant attribuable à l'interaction des phosphatidylcholines oxydées (PCox) avec le récepteur CD36 (Podrez et al., 2000). Les études ayant utilisées la forme fortement oxydée du LDL (oxydation avec du CuSO<sub>4</sub>) ont montré que le CD36 reconnaît et lie les PLox retrouvés aussi bien au niveau de la phase lipidique de la lipoprotéine qu'au niveau de la phase protéique (apolipoprotéine B) (Boullier et al., 2000). Les analyses structure/fonction réalisées par Podrez et al. ont permis de définir la structure des PLox qui régule leur interaction avec le CD36: il s'agit en effet des PLs (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine, ou acide

phosphatidique) portant un groupement carbonyle insaturé incorporant une partie terminale  $\gamma$ -hydroxy (ou oxo)- $\alpha,\beta$  en position un *sn*-2 (Figure 16). Ces structures sont identifiées actuellement sous l'acronyme de PCox<sub>CD36</sub> (Podrez et al., 2002a; Podrez et al., 2002b). Ces PCox<sub>CD36</sub> lient le CD36 sur un domaine de liaison formé par un regroupement de résidus lysine chargés positivement au niveau du domaine extracellulaire du récepteur qui interagissent spécifiquement avec les charges négatives des LDLox (Doi et al. 1993). Les PCox sont générés lorsque le LDL ou les phospholipides cellulaires contenant des acides gras polyinsaturés (PUFA) subissent des modifications oxydatives résultant soit dans l'addition d'un atome d'oxygène à l'acide gras situé en position *sn*-2 ou dans la fragmentation de ce dernier (Ashraf et al., 2009). L'oxydation du 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycéro-3-phosphorylcholine (PAPC) conduit à la formation du 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (POVPC), 1-palmitoyl-2-glutaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (PGPC) ou du 1-palmitoyl-2-(5,6-époxyisoprostane E2)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (PEIPC) qui sont de puissants médiateurs inflammatoires (Ashraf et al., 2009) (Figure 16). Le POVPC est l'un des PCox<sub>CD36</sub> à haute affinité du CD36; ainsi l'utilisation d'un anticorps monoclonal (EO6) reconnaissant spécifiquement le POVPC inhibe de plus de 70% la liaison du LDLox au CD36 (Boullier et al., 2000). Au niveau du CD36, les acides aminés 160–168 ont été identifiés comme le site de liaison des PCox<sub>CD36</sub>, les lysines 164 et 166 étant indispensables pour la liaison (Kar et al., 2008). Les PCox<sub>CD36</sub> présentent une liaison de haute affinité envers le CD36 et activent l'endocytose du ligand qui contient ces structures (Greenberg et al., 2006; Sun et al., 2006; Greenberg et al. 2008).



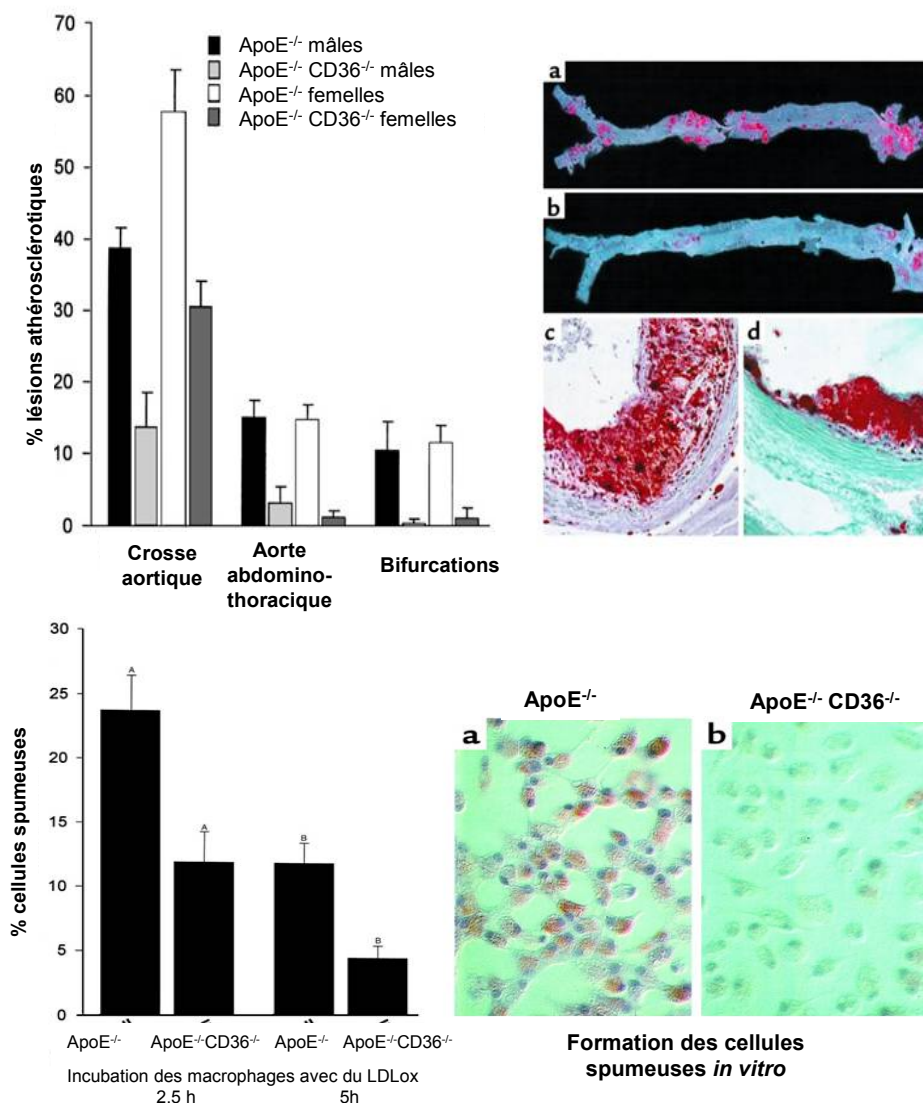
**Figure 16. Structures chimiques des PCox<sub>CD36</sub>.** Les PLox sont générés lorsque les acides gras contenus dans le LDL subissent des modifications oxydatives résultant soit dans l'addition d'un atome d'oxygène à l'acide gras situé en position sn-2 ou dans la fragmentation de ce dernier (figure traduite et modifiée de Ashraf et al., 2009) [Reprinted from *Int J Biochem Cell Biol.* 41(6), Ashraf MZ, Kar NS, Podrez EA, *Oxidized phospholipids: Biomarker for cardiovascular diseases*, Pages 1241-1244, Copyright (2009), with permission from Elsevier].

La génération du modèle de souris déficientes en CD36 (Febbraio et al., 1999) et croisées aux souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup>) (Febbraio et al., 2000) a permis l'étude *in vivo* du rôle du CD36 dans le développement de l'athérosclérose. Les premières études ont utilisé des souris apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> (aussi appelées *double knock out*, DKO) croisées quatre fois sur un fond génétique C57Bl/6. À l'âge de 4 semaines, les souris ont été placées sur une diète enrichie en lipides et en cholestérol (Western diet) pendant une période de 12 semaines. Comparées aux souris apoE<sup>-/-</sup>, les souris apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> ont montré une réduction de 76% des lésions

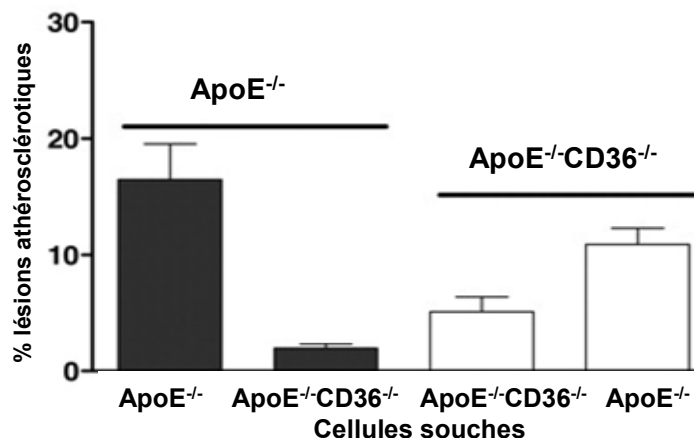


athérosclérotiques, associées *in vitro* à une réduction de 60% de l'internalisation du LDLox par les macrophages et à une diminution de 61% de la formation des cellules spumeuses (Febbraio et al., 2000) (Figure 17).

Febbraio et al. ont également montré que c'est la déficience en CD36 au niveau des monocytes/macrophages qui protège contre le développement des lésions athérosclérotiques. Ainsi, l'irradiation des souris apoE<sup>-/-</sup>, leur transplantation avec des cellules souches apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> suivie par l'administration d'une diète riche en lipides de type Western protègent les premières contre le développement de l'athérosclérose. Par contre, les souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> reconstituées avec des cellules monocytaires apoE<sup>-/-</sup> exprimant le CD36 montrent une augmentation de plus du double de la surface des lésions (Febbraio et al., 2004) (Figure 18).

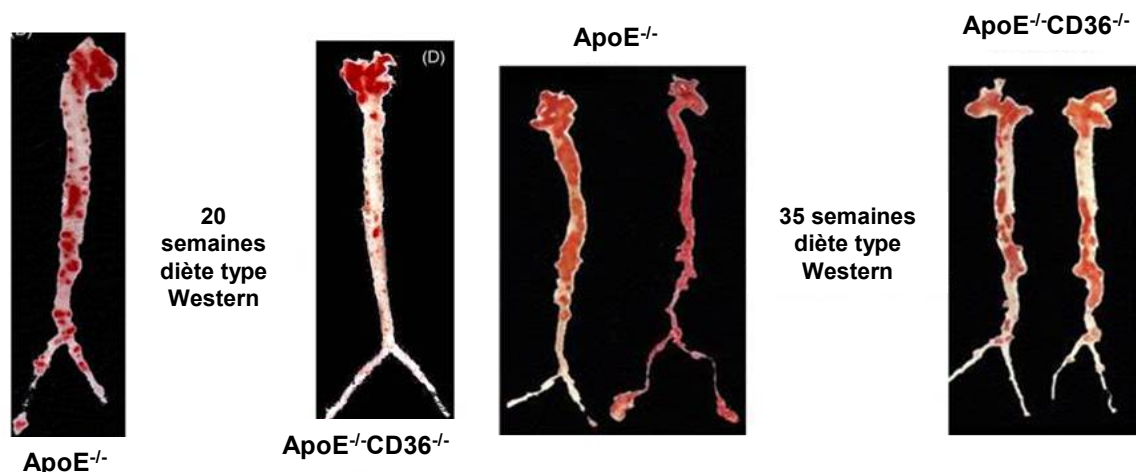


**Figure 17. Les souris apoE<sup>-/-</sup> déficientes en CD36 sont protégées contre le développement de l'athérosclérose.** Comparées aux souris apoE<sup>-/-</sup> (a, c), les apoE<sup>-/-</sup> CD36<sup>-/-</sup> présentent moins de lésions (b) et sont moins complexes (d) (figure du haut). La formation des cellules spumeuses est fortement réduite au niveau des macrophages apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> (figure du bas) (figure traduite de Febbraio et al., 2000) [Reproduced with permission of The American Society for Clinical Investigation, from Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice, Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL., J. Clin. Invest. 105:1049–1056 (2000)]. [The journal of clinical investigation by Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL.. Copyright 2000 by AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION. Reproduced with permission of AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION in the format Dissertation via Copyright Clearance Center].



**Figure 18.** Le CD36 exprimé au niveau des monocytes/macrophages est pro-athérogène. Les souris apoE<sup>-/-</sup> (barres noires) et apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> (barres blanches) ont été irradiées et reconstituées avec des cellules souches de souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> ou apoE<sup>-/-</sup> (figure traduite de Febbraio et al., 2004) [Febbraio et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 2333-2338, with permission of Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins].

Le rôle du CD36 n'est pas limité uniquement aux phases précoces du développement de l'athérosclérose; il contribue aussi à la progression des lésions même aux étapes avancées de la pathologie. Guy et al. ont montré que les souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> croisées six fois sur un fond génétique C57Bl/6 et nourries avec une diète de type Western pour 20 ou 35 semaines, montrent une réduction de 25% et 35% des lésions athérosclérotiques par rapport aux souris apoE<sup>-/-</sup>. À 35 semaines d'âge, les aortes des souris apoE<sup>-/-</sup> sont sclérotiques et presque complètement obstruées par les lésions, alors que celles des souris déficientes en CD36 présentent des lésions plus petites et non calcifiées (Guy et al., 2007) (Figure 19).



**Figure 19. Les souris  $\text{apoE}^{-/-}\text{CD36}^{-/-}$  sont protégées contre le développement de l'athérosclérose même à des stades avancés de la pathologie** (figure traduite de Guy et al., 2007) [Reprinted from *Atherosclerosis*, 192(1), Guy E, Kuchibhotla S, Silverstein R, Febbraio M, Continued inhibition of atherosclerotic lesion development in long term Western diet fed  $\text{CD36}^{-/-}/\text{apoE}^{-/-}$  mice, Pages 123-130, Copyright (2007), with permission from Elsevier].

Utilisant des souris  $\text{apoE}^{-/-}\text{CD36}^{-/-}$  croisées neuf fois sur un fond génétique de C57Bl/6, donc génétiquement pures à plus de 99%, Kuchibhotla et al. ont confirmé les observations précédentes impliquant le rôle du CD36 dans l'athérosclérose. De plus, le groupe a montré que le rôle pro-athérosclérotique du CD36 n'est pas uniquement limité à l'internalisation des LDL modifiées, mais que le CD36 est impliqué dans le développement d'une réponse inflammatoire systémique et cellulaire. Ainsi, les souris  $\text{apoE}^{-/-}\text{CD36}^{-/-}$  présentent une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires au niveau plasmatique, incluant l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-12, l'INF $\gamma$ , le TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  et MIP-2. De plus, les macrophages péritonéaux des souris  $\text{apoE}^{-/-}$  incubés avec du LDLox sécrètent  $\sim 1.5$ -fois plus d'IL-1 $\alpha$  que les macrophages déficients en CD36 et génèrent  $\sim 3.8$ -fois plus de ROS intracellulaires. (Kuchibhotla et al., 2008).

Le récepteur CD36 est également impliqué dans les complications liées à l'athérosclérose telle que l'athérombose. Le LDLox (Shaw et al., 2001) et les PCox<sub>CD36</sub> (Podrez et al., 2007) retrouvés au niveau plasmatique des souris et des patients hypercholestérolémiques peuvent activer les plaquettes de façon dépendante du CD36. Ainsi, il a été suggéré que le CD36 exprimé au niveau des plaquettes constitue le lien entre la dyslipidémie, le stress oxydatif, l'hyperréactivité plaquettaire et les états thrombotiques (Podrez et al., 2007). L'implication du CD36 dans la formation du thrombus n'est pas limitée uniquement à l'activation des plaquettes par le LDLox et les PLox, mais également par certaines microparticules. Ces dernières sont des vésicules qui peuvent être retrouvées en circulation chez les sujets souffrant de syndrome coronarien aigu (Bernal-Mizrachi et al., 2003) et qui peuvent bourgeonner à partir des cellules endothéliales (*endothelial microparticules* EMPs) activées par des cytokines inflammatoires (Jimenez et al., 2003). Ghosh et al. ont montré que la pré-incubation des plaquettes avec les microparticules de phospholipides les activent de façon dépendante du CD36 avec une augmentation de l'activation de  $\alpha_2\beta_3$ , de l'expression de la sélectine-P, de l'agrégation plaquettaire et de la formation du thrombus *in vivo* (Ghosh et al., 2008; Silvertein, 2009). Notons également que les plaquettes isolées des sujets diabétiques présentent une augmentation de l'expression du CD36 plaquettaire qui s'accompagne *in vitro* par une augmentation de l'internalisation de l'acide arachidonique, de la synthèse du TXA2 et d'un état inflammatoire et pro-thrombotique (Salah-Uddin et al., 2002).

Le rôle pro-athérosclérotique du CD36 a été remis en question par les observations de Moore et al., qui ont rapporté que les souris mâles apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> nourries avec une diète

enrichie en lipides pendant huit semaines ne présentaient aucune différence du pourcentage de lésions au niveau du sinus aortique par comparaison aux souris apoE<sup>-/-</sup>, tandis que les souris femelles présentaient même une augmentation de ces lésions (Moore et al., 2005). Cependant cette étude a soulevé plusieurs critiques et plusieurs ont suggéré que: 1) la présence potentielle d'agents pathogènes, tels que *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia pneumoniae* ou les cytomégalovirus pouvant avoir infecté les colonies étudiées de souris pourrait être responsable de ces observations conflictuelles (Burnett et al., 2001); 2) la taille des lésions au niveau du sinus aortique est une fonction non linéaire de la progression des lésions et elle est non représentative du développement différentiel des lésions au niveau des différentes sections du tronc vasculaire (Febbraio and Silverstein, 2007); 3) les analyses de lésions ont été effectuées uniquement à la 8<sup>ème</sup> semaine d'âge alors qu'elles auraient dues être faites à différents intervalles de temps, pouvant aller jusqu'à 12, 20 et même 35 semaines d'âge par exemple (Guy et al, 2007). Notons cependant que très récemment, le même groupe qui a lancé la controverse a publié des expériences avec des souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> où ils montré une diminution drastique du pourcentage de lésions et où ils ont fini par conclure que le CD36 est en fait pro-athérosclérotique (Stewart et al., 2010).

En conclusion, nous avons présenté dans cette partie un ensemble de données qui appuient fortement l'implication du CD36 dans l'athérosclérose.

## Chapitre 3. Hypothèses, Objectifs et Méthodes

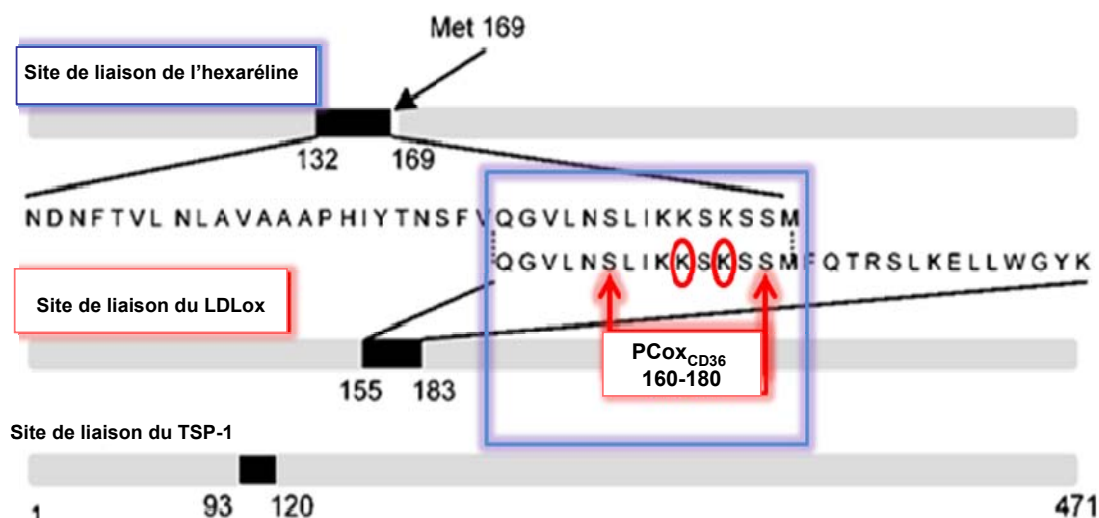
### 3.1. Les sécrétines peptidiques de l'hormone de croissance en tant que ligands sélectifs du récepteur CD36

Les sécrétines peptidiques de l'hormone de croissance (*Growth Hormone-Releasing Peptides*, GHRPs) sont des peptides synthétiques dérivés de la Met-enképhaline qui stimulent la sécrétion de l'hormone de croissance (HC) par la stimulation des récepteurs GHS-R1a (*Growth Hormone Secretagogues Receptor-1a*) au niveau de l'hypophyse (Bowers, 1998). Le premier GHRP qui a été exploité pour ses effets sécrétagogues de l'HC *in vivo et in vitro* fut l'hexapeptide GHRP-6 (*His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>*). Deghenghi et ses collaborateurs ont par la suite synthétisé des peptides plus résistants aux dégradations métaboliques, dont l'hexaréline (*His-D2MeTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>*) (Deghenghi et al, 1994).

L'effet cardioprotecteur de l'HC et/ou de l'«*insulin-like growth factor-1*» (IGF-1) est largement documenté (Sacca et al., 1994) et l'administration de l'HC ou de ses sécrétines (GHRPs) a été suggérée dans le traitement des cardiomyopathies (Marleau et al., 2006). Cependant, les études du groupe de Locatelli ont montré que dans le modèle d'ischémie/reperfusion du cœur de rats hypophysotectomisés, l'hexaréline exerce des effets cardioprotecteurs malgré la déficience de ces rats en HC (Locatelli et al., 1999). Il a été conclu que les GHRPs exercent des effets cardioprotecteurs indépendamment de l'axe HC/IGF1, liés possiblement à une action directe sur des récepteurs spécifiques, différents des GHS-R1a, exprimés au niveau du myocarde (Locatelli et al., 1999; De Gennaro-Colonna et al., 2000).

Les études de l'équipe de Ong ont permis d'identifier le CD36 comme un récepteur de l'hexaréline au niveau du myocarde par des essais de liaison covalente au niveau des membranes cardiaques de rats (Bodart et al., 1999; Bodart et al., 2002). Autour de la même période, il a été montré que le récepteur GHS-R1a est aussi exprimé au niveau du myocarde (Gnanapavan et al., 2002). Cependant, les expériences subséquentes de l'équipe de Locatelli ont permis de conclure que l'hexaréline protège le cœur contre les dommages tissulaires post-ischémiques par des effets médiés en partie par le GHS-R1a, mais majoritairement par une interaction avec le récepteur CD36 (Torsello et al., 2003). Étant donné l'importance du CD36 dans l'athérosclérose tel que suggéré par les études de Febbraio (Febbraio et al., 2000), des études ont été entreprises par le laboratoire de Ong afin de vérifier si le site de liaison des GHRPs chevauche avec celui du LDLox au niveau du CD36 (Demers et al., 2004). Utilisant une technique de photomarquage covalent du CD36, les résidus 132-169 du récepteur CD36 ont été identifiés comme étant le site de liaison de l'hexaréline (Demers et al., 2004). De façon intéressante, il s'est avéré que ce domaine de liaison chevauche avec celui des LDLox au niveau des monocytes/macrophages (résidus 155-183) (Navazo et al., 1996). De plus, le domaine de liaison des GHRPs au CD36 inclut les résidus lysine 164 et 166 qui sont nécessaires pour que l'internalisation des PCox<sub>CD36</sub> ait lieu et pour qu'il y ait formation des cellules spumeuses (Kar et al., 2008). Notons que les études de Demers et al. ont montré une spécificité de liaison des GHRPs au niveau des résidus 132-169 du récepteur CD36, sans aucune compétition avec la TSP-1 (Demers et al., 2004) dont le domaine de liaison au CD36 correspond aux résidus 93-120 (Pearce et al., 1998) (Figure 20).





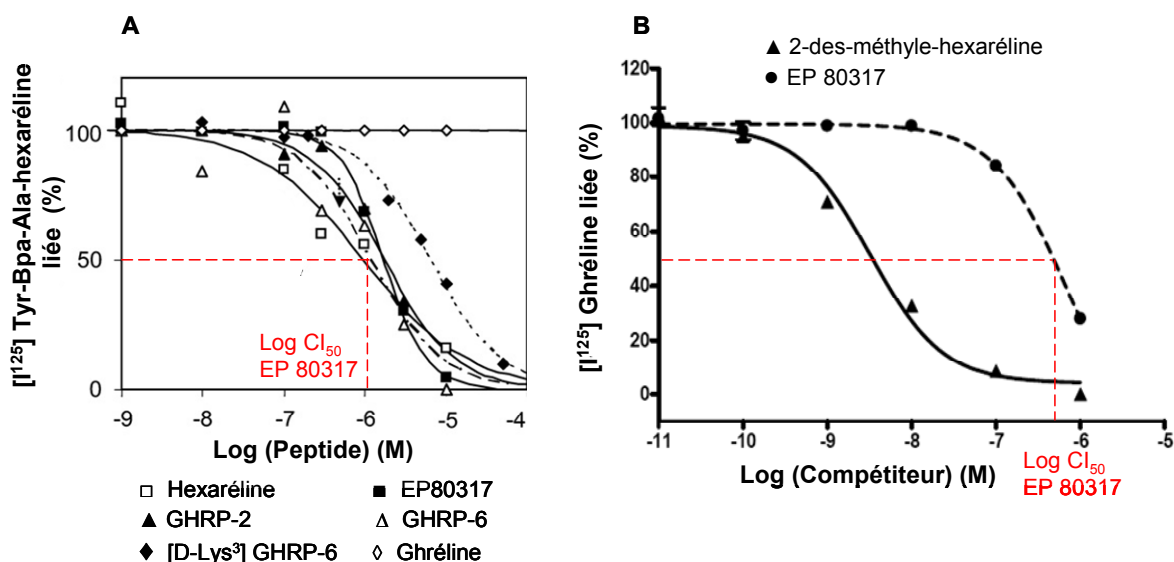
**Figure 20. Site de liaison de l'hexaréline sur le récepteur CD36.** Le domaine de liaison des analogues des GHRPs (résidus 132-169) au CD36 chevauche avec celui des LDLox (résidus 155-183) et plus spécifiquement avec celui des PCox<sub>CD36</sub> (résidus 160-168), incluant les 2 lysines indispensables à la liaison des PCox<sub>CD36</sub> au CD36 au niveau des monocytes/macrophages et des plaquettes (Lys 164 et 166) (figure modifiée de Demers et al., 2004) [This research was originally published in *Biochemical Journal*. Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R, Ong H., Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study, *Biochem. J.*, 2004; 382: 417–424, © 2004 Biochemical Society].

Nos travaux avaient pour but de mieux comprendre le rôle du CD36 dans l'athérosclérose. Le premier analogue des GHRPs testés pour ces propriétés anti-athérosclérotiques potentielles fut l'hexaréline. Nos études ont montré une réduction modeste (~28%) mais significative du pourcentage de lésions athérosclérotiques chez les souris déficientes en apoE<sup>-/-</sup> soumises à une diète enrichie en lipides et en cholestérol (Avallone et al., 2006). L'hexaréline présente cependant une affinité de liaison aussi bien pour le récepteur CD36 que pour le récepteur GHS-R1a (Bodart et al., 2002; Deghenghi et al. 1994). Il est cependant difficile de discerner l'implication du CD36 dans l'athérosclérose avec un outil pharmacologique qui, en plus de lier le CD36,

pourrait activer directement la signalisation du GHS-R1a par liaison de ce dernier au niveau des tissus et cellules qui l'expriment, surtout ceux impliqués dans le développement de l'athérosclérose, tels que les monocytes (Dixit et al., 2004), les macrophages (Avallone et al., 2006), l'endothélium vasculaire (Baldanzi et al., 2002; Iantorno et al., 2007) et les cellules musculaires lisses vasculaires (Wu et al., 2004). Dans le but d'élucider le rôle spécifique du CD36 dans l'athérosclérose, les analogues GHRPs présentant une sélectivité de liaison élevée envers le récepteur CD36 ont été choisis pour nos études, dont le EP 80317 (*Haic-D2MeTrp-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>*) et le EP 80318 (*Atab-D2MeTrp-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>*).

### **3.2. Hypothèse de recherche**

Du fait que le EP 80317 présente un site de liaison qui chevauche avec celui des LDLox au niveau de CD36 (Demers et al., 2004), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le EP 80317, comme ligand sélectif du CD36, interfère avec l'internalisation et le métabolisme des LDLox au niveau des macrophages et exerce ainsi des effets anti-athérosclérotiques.



**Figure 21. A. Courbes de compétition des GHRPs avec la  $[^{125}\text{I}]$ Tyr-Bpa-Ala-hexaréline pour la liaison au récepteur CD36 photomarké** (figure modifiée de Demers et al., 2004) [*This research was originally published in Biochemical Journal. Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R, Ong H., Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study, Biochem. J., 2004; 382: 417–424, © 2004 Biochemical Society*]. **B. Courbes de compétition du EP 80317 ou de la des-méthyle-hexaréline avec la ghréline pour la liaison au GHS-R1a** (figure modifiée de Bujold et al., 2009) [*Reprinted from Bujold et al., Cardiovasc Res. 2009. 83(3):457-64, by permission of Oxford University Press*].

### 3.3. Objectifs

Notre première étude avait pour but de trouver réponse aux questions suivantes :

- Est-ce que l'administration chronique d'un ligand sélectif du CD36 prévient le développement des lésions athérosclérotiques?
- Dans l'affirmative, est-ce que l'administration chronique d'un ligand sélectif du CD36 pourrait avoir un effet curatif?

- Par quels mécanismes les ligands sélectifs du CD36 exercent-ils un effet anti-athérosclérotique?

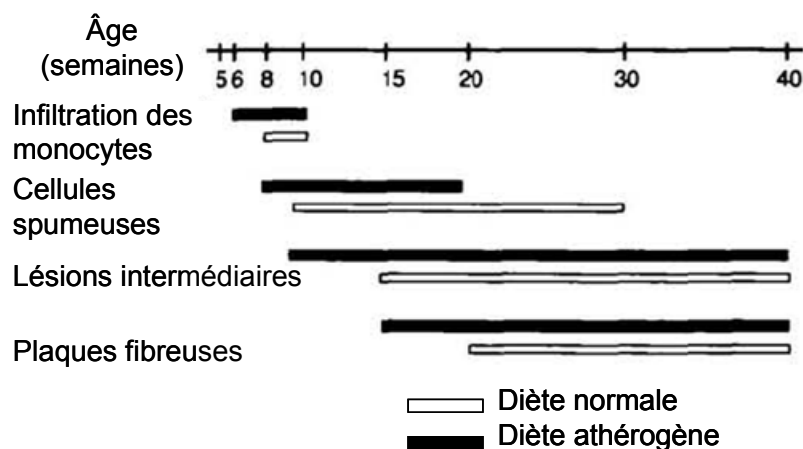
### **3.4. Modèles expérimentaux**

Plusieurs espèces animales ont été utilisées dans la littérature pour étudier la pathogenèse de l'athérosclérose et pour évaluer les traitements anti-athérosclérotiques. Les modèles animaux les plus utiles ont été restreints jusqu'au début des années 90 à de larges animaux tels que les primates, les cochons et les lapins. Ces modèles animaux présentent cependant des lacunes importantes: les lapins sous diète riche en gras présentent par exemple des lésions qui ne miment pas les lésions humaines du fait qu'elles sont beaucoup plus riches en lipides et en macrophages (Jawień et al., 2004). Les cochons et les singes, bien que considérés comme des modèles animaux plus appropriés pour mimer la maladie humaine, sont associés à un coût élevé et sont plus difficiles à manipuler. L'utilisation des rongeurs, telles que les souris, permet de surmonter certains de ces problèmes et rend possible la planification de protocoles expérimentaux incorporant un grand nombre d'animaux (Jawień et al., 2004). Notons que la majorité des lignées de souris sont résistantes au développement de l'athérosclérose. Par contre, les souris C57BL/6 nourries avec une diète riche en lipides et en cholestérol et contenant de l'acide cholique développent, au niveau des valves aortiques, de fines couches sous-endothéliales de cellules spumeuses (Jawień et al., 2004). Cependant, l'étude de l'athérosclérose chez ces souris est limitée du fait que les lésions ne se développent pas au niveau des mêmes sites anatomiques que les lésions humaines, ne progressent pas avec le temps, et que la diète qui doit être utilisée doit

contenir des niveaux élevés de cholate qui est un composant non physiologique et hépatotoxique (Jawień et al., 2004). C'est ainsi que les modèles murins transgéniques présentant une perturbation du métabolisme lipidique (Plump et al., 1992) ont été développés sur un fond génétique C57BL/6J, telles que les souris déficientes en apolipoprotéine E (souris apoE<sup>-/-</sup>) (Nakashima et al., 1994) ou en récepteurs LDL (LDLR<sup>-/-</sup>) (Ishibashi et al., 1993).

L'apoE est une glycoprotéine synthétisée essentiellement par le cerveau et le foie, et c'est un constituant de toutes les lipoprotéines, à l'exception des LDL. L'apoE joue un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines: 1) c'est un ligand pour les récepteurs hépatiques qui permettent la clairance des chylomicrons et des VLDL par le foie (LDLR et *LDL receptor related protein, LRP*); 2) l'apoE synthétisée par les macrophages au niveau des vaisseaux joue un rôle dans l'inhibition de l'inflammation vasculaire et dans l'homéostasie cellulaire du cholestérol (efflux); 3) l'apoE réduit l'absorption intestinale du cholestérol et augmente son excrétion biliaire (Meir and Leitersdorf, 2004). Les souris apoE<sup>-/-</sup> et LDLR<sup>-/-</sup> sont les 2 modèles murins d'athérosclérose les plus utilisés dans l'athérosclérose. Ces deux modèles présentent plusieurs différences phénotypiques. Lorsque soumises à une diète normale, les souris apoE<sup>-/-</sup> développent une hypercholestérolémie (niveaux de cholestérol ~ 10-13 mmol/L) où le cholestérol est contenu essentiellement dans la fraction non-HDL (Plump et al., 1992; Nakashima et al., 1994). Chez les souris apoE<sup>-/-</sup>, l'utilisation de diètes athérogènes riches en lipides et en cholestérol (diète de type Western ou de type HFHC) augmente drastiquement les niveaux plasmatiques de cholestérol (>29.5 mmol/L) et permet

d'exacerber et d'accélérer le développement de l'athérosclérose (Plump and Breslow, 1995; Nakashima et al., 1994) (Figure 22).



**Figure 22. Formation des lésions athérosclérotiques chez les souris déficientes en apolipoprotéine E.** Diagramme montrant le *timeline* associé à la formation des lésions athérosclérotiques chez les souris *apoE*<sup>-/-</sup> (figure traduite de Nakashima et al., 1994) [Nakashima et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; 14: 133-140, with permission of Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins].

Au niveau morphologique, les lésions athérosclérotiques des souris *apoE*<sup>-/-</sup> ressemblent à celles humaines (Meir and Leitersdorf, 2004) et présentent toutes les étapes caractéristiques de la pathologie chez l'homme, allant des stries lipidiques aux plaques fibreuses et vulnérables (Nakashima et al., 1994; Reddick et al., 1994). Des lésions complexes peuvent même être détectées au niveau de l'artère carotide (Johnson et al., 2001) ou au niveau de l'artère brachiocéphalique chez les souris âgées (> 42 semaines) où une rupture de la chape fibreuse et une hémorragie intra-plaque peuvent être observées (Rosenfeld et al., 2000; Williams et al., 2002). Les lésions des souris *apoE*<sup>-/-</sup> présentent des caractéristiques inflammatoires et oxydatives similaires à celles identifiées chez l'homme au niveau des plaques ainsi qu'au niveau de la circulation

sanguine (augmentation de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et présence des PCox<sub>CD36</sub>) (Podrez et al., 2007). Au niveau tissulaire, la conversion des macrophages en cellules spumeuses et la présence du LDLox et des PLox est observée au niveau des plaques (Podrez et al., 2002a). Sous une diète normale, les souris LDLR<sup>-/-</sup> développent une hypercholestérolémie plus limitée que celle observée avec les apoE<sup>-/-</sup> (5-6.5 mmol/L) mais ces souris ne développent que des lésions athérosclérotiques minimales (Powell-Braxton et al., 1995; Ishibashi et al., 1993). Sous une diète de type Western, les souris LDLR<sup>-/-</sup> présentent une exacerbation de l'hypercholestérolémie (~31 mmol/L) mais le développement de l'athérosclérose reste plus limité que celui des souris apoE<sup>-/-</sup> (Lichtman et al., 1999, Nakashima et al., 1994). Une autre différence entre ces 2 lignées est leur profil inflammatoire et oxydatif. Comme chez l'homme (Shaw et al., 2001), les souris apoE<sup>-/-</sup> produisent des anticorps dirigés contre des épitopes du LDLox (Horkko et al., 1999; Chang et al., 1999) qui ne sont présents que minimalement chez les souris LDLR<sup>-/-</sup> (Kennedy et al., 2009). De plus, comparé au LDL isolé du plasma des souris LDLR<sup>-/-</sup>, le LDL isolé des souris apoE<sup>-/-</sup> présente un certain degré d'oxydation (sans aucune modification exogène) qui induit *in vitro* la formation des cellules spumeuses principalement via son interaction avec le CD36, alors que le LDL isolé des souris LDLR<sup>-/-</sup> est mal reconnu par les récepteurs éboueurs (CD36, SR-A) (Zhao et al., 2005). Étant donné ces différences, le modèle de souris apoE<sup>-/-</sup> s'est avéré être plus approprié pour nos études expérimentales que le modèle LDLR<sup>-/-</sup>. Il faut cependant signaler que toutes les lignées de souris présentent des profils lipidiques différents de ceux de l'homme, avec des niveaux naturellement élevés de HDL et bas de LDL. De plus, les souris sont déficientes en CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) qui assure le

transfert des esters de cholestérol du HDL aux VLDL et LDL (Meir and Leitersdorf, 2004). Malgré ces différences, les souris apoE<sup>-/-</sup> présentent un phénotype athérosclérotique qui mime la pathologie humaine et sont considérées un modèle de choix dans l'étude expérimentale de l'athérosclérose (Jawień et al., 2004; Drew, 2000).

Afin de vérifier les effets anti-athérosclérotiques des ligands sélectifs du CD36, nous avons utilisé des souris apoE<sup>-/-</sup> et apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> (Febbraio et al., 2000) soumises à une diète riche en lipides et cholestérol (diète HFHC; Research Diets Inc. # D12108 contenant 40 kcal% en lipides saturés, 1.25% en cholestérol, 0% acide cholique) à partir de 4 ou 6 semaines d'âge. Les souris ont été réparties arbitrairement en 2 groupes et traitées par injection s.c. avec le EP 80317 (300 µg/kg/jour) ou le véhicule, NaCl 0.9%, pendant différentes périodes de temps jusqu'à leur sacrifice à 18 semaines d'âge. La dose du EP 80317 a été choisie à partir d'études préliminaires d'essais dose-réponse (Marleau et al., non publié). La diète D12108 a été choisie du fait qu'elle contient un pourcentage élevé en cholestérol, ce qui nous permet d'accélérer le développement de l'athérosclérose et de raccourcir la durée de l'étude (sacrifice à 18 semaines). Très récemment, Kennedy et al. ont montré qu'afin d'étudier le rôle du CD36 dans les modèles murins, il faut que les souris soient nourries une diète riche en lipides et en cholestérol (1.125% cholestérol) plutôt qu'une diète de type Western (0.2% cholestérol) ou normale. En effet, le groupe a montré que des teneurs élevées en cholestérol, comme celles utilisées dans nos expériences, sont nécessaires pour induire une réponse inflammatoire (Vergnes et al., 2003) qui permet de générer *in vivo* les ligands athérogènes du CD36, les PCox<sub>CD36</sub> (Kennedy et al., 2009).



## RÉSULTATS

## Chapitre 4. Liste des publications

### 4.1. Publications à titre de première auteure

**EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions.** Marleau S\*, **Harb D\***, Bujold K\*, Avallone R, Iken K, Wang Y, Demers A, Sirois MG, Febbraio M, Silverstein RL, Tremblay A, Ong H. *FASEB J.* 2005;19(13):1869-71.\* Contribution égale

**The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation.** Harb D, Bujold K, Febbraio M, Sirois MG, Ong H, Marleau S. *Cardiovasc Res.* 2009; 83 (1):42-51.

**Microvascular endothelial CD36 regulates polymorphonuclear leukocyte trafficking to acute inflammatory sites in mice: a role for myeloid-related proteins S100A8/A9.** Harb D, Huynh DN, Mellal K, Borgeat P, Tessier P, Ong H, Marleau S.

### 4.2. Publications à titre de co-auteur

**A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway.** Avallone R, Demers A, Rodrigue-Way A, Bujold K, **Harb D**, Anghel S, Wahli W, Marleau S, Ong H, Tremblay A. *Mol Endocrinol.* 2006;20 (12):3165-78.

### 4.3. Abrégés publiés

**Harb D**, Ong H, Marleau S. The anti-atherosclerotic effects of EP 80317, a selective ligand of CD36, are associated with anti-inflammatory actions. *Can J Cardiol*, 2007; **23** (Suppl SC), 0590.

**Harb D**, Hamdan L, Béssi V, Bélanger C, Koutsing Tine M-C, Ong H, Marleau S. EP80317, a ligand of CD36 receptor, protects against remote lung injury after hindlimb ischemia/reperfusion. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2007; **10(4):1s-186s**.

**Harb D**, Febbraio M, Ong H, Marleau S. Growth Hormone-Releasing Peptides as anti-atherosclerotic agents inhibits macrophages trafficking to atherosclerotic lesions through CD36 but not through the ghrelin receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; **26(5)**, e-98.

Hamdan L, Taillefer R, **Harb D**, Bélanger C, Koutsing Tine M-C, Borgeat P, Ong H, Marleau S. Growth Hormone-Releasing Peptides protect against remote lung injury after hindlimb ischemia/reperfusion in apolipoprotein-deficient mice. *Inflamm Res*, 2007; **Supp 3 (56): S386-S387**.

**Harb D**, Febbraio M, Ong H, Marleau S. EP 80317, a selective ligand of the CD36 scavenger receptor, reduces <sup>111</sup>In-labeled macrophages trafficking to atherosclerotic lesions. *Faseb J*, 2006; **20(4):A666**.

**Harb D**, Bujold K, Febbraio M, Sirois M.G, Tremblay A, Marleau S, Ong H. Les effets anti-athérosclérotiques des Growth Hormone-Releasing Peptides. *Médecine Sciences*, 2005; Supp 2 (21):20.

**Harb D**, Bujold K, Febbraio M, Sirois M.G, Tremblay A, Ong H, Marleau S. Growth Hormone-Releasing Peptides: a novel class of anti-atherosclerotic agents. *Inflamm Res*, 2005; Supp 2 (54): S207.

**Harb D**, Bujold K, Febbraio M, Sirois M.G, Tremblay A, Ong H, Marleau S. The anti-atherosclerotic effects of the GHRPs are CD36 dependent. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2005; 8(3):483.

Marleau S, **Harb D**, Bujold K, Avallone R, Demers A, Sirois M.G, Febbraio M, Tremblay A, Ong H. Interfering with CD36 scavenger receptor function protects apolipoprotein E- deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *Braz J Pharm Sci*, 2005; Supp 1(41):35.

**Harb D**, Sirois M.G, Marleau S, Ong H. The anti-atherosclerotic effect of the Growth Hormone-Releasing Peptides is not mediated via the ghrelin receptor. *Médecine Sciences*, 2004; Supp 2 (20):36.

## **Chapitre 5**

**EP 80317, un ligand du récepteur CD36, protège les souris déficientes  
en apolipoprotéine E contre le développement des lésions  
athérosclérotiques**

### 5.1. Contributions à la publication

- Réalisation de la majorité des expériences *in vivo*, réalisation de l'étude de l'internalisation du LDLox *ex vivo* et des dosages plasmatiques des lipoprotéines.
- Analyse / présentation graphique des résultats.
- Participation à la préparation de l'article.

### 5.2. Résumé

Le CD36, un récepteur éboueur de type B exprimé par les macrophages, joue un rôle majeur dans la formation des stries lipidiques via l'internalisation des lipoprotéines oxydées. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le EP 80317, un ligand du CD36 dérivé de la famille des sécrétines de l'hormone de croissance mais dépourvu d'activité sécrétagogue, exerce des effets anti-athérosclérotiques chez les souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE<sup>-/-</sup>) nourries avec une diète athérogène à partir de l'âge de six semaines. Des injections quotidiennes s.c. du EP 80317 (300 µg/kg) ou du véhicule ont été initiées à l'âge de 6, 10, 12 ou 14-semaines jusqu'au sacrifice à la 18ème semaine. Comparées aux souris témoins, les souris apoE<sup>-/-</sup> traitées avec le EP 80317 ont montré une réduction importante (jusqu'à 51%) des lésions du tronc aortique. Un traitement chronique avec le EP 80317 (12 semaines) est également associé à une réduction de 30% du cholestérol total plasmatique, suggérant un effet potentiel de ce peptide au niveau du métabolisme intestinal/hépatique du cholestérol. Le EP 80317 exerce des effets anti-athérosclérotiques préventifs et curatifs qui sont réversibles après l'arrêt du traitement. Au niveau des macrophages, le EP 80317 a réduit l'internalisation du LDLox et a augmenté l'expression des gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol incluant les

récepteurs «*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* » (PPAR $\gamma$ ), «*liver x receptor  $\alpha$* » (LXR $\alpha$ ) et les transporteurs «*ATP-binding cassette (ABC)*» ABCA1 et ABCG1. Les effets du EP 80317 sont dépendants de la présence (ou de l'expression) du CD36 car aucun effet anti-athérosclérotique ou hypocholestérolémiant, ni aucune modulation de la voie de PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ - transporteurs ABC ont été observés chez les souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> traitées avec le EP 80317. Nos résultats suggèrent que le EP 80317, comme ligand sélectif du CD36, pourrait représenter le prototype d'une nouvelle classe d'agents anti-athérosclérotiques.

**EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions**

**Sylvie Marleau,<sup>\*,1</sup> Diala Harb,<sup>\*,1</sup> Kim Bujold,<sup>\*,1</sup> Roberta Avallone,<sup>\*</sup> Khadija Iken,<sup>\*</sup> Yanfei Wang,<sup>\*</sup> Annie Demers,<sup>\*</sup> Martin G. Sirois,<sup>†</sup> Maria Febbraio,<sup>§</sup> Roy L. Silverstein,<sup>§</sup> André Tremblay,<sup>‡</sup> Huy, Ong<sup>\*,‡,2</sup>**

<sup>\*</sup>Faculty of Pharmacy, Departments of <sup>†</sup>Pharmacology, <sup>‡</sup>Obstetrics & Gynecology and Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, Canada

<sup>†</sup>Montreal Heart Institute, Montréal, Québec, Canada

<sup>§</sup>Department of Cell Biology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, USA

<sup>‡</sup> Ste-Justine Hospital Research Center, Québec, Canada

**Key words:** atherosclerosis; lipid metabolism; lipoproteins; macrophages; growth hormone-releasing peptide

**<sup>1</sup>Contributed equally to the work**

**<sup>2</sup>Correspondence to:** Dr. Huy Ong, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Pavillon Jean-Coutu, P.O.Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7.

*The FASEB journal by Marleau, S.\*, Harb, D.\*, Bujold, K.\*, Avallone, R., Iken, K., Wang, Y., Demers, A., Sirois, M.G., Febbraio, M., Silverstein, R.L., Tremblay, A. and Ong, H.. Copyright 2011 by FEDN OF AM SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIO (FASEB). Reproduced with permission of FEDN OF AM SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIO (FASEB) in the format Dissertation via Copyright Clearance Center.*



## ABSTRACT

CD36, a type B scavenger receptor expressed on macrophages, appears to play a major role in fatty streak formation through scavenging oxidatively modified lipoproteins in the arterial wall. We tested the hypothesis that EP 80317, a novel CD36 ligand derived from the growth hormone (GH)-releasing peptide family but devoided of any GH releasing activity, exerts anti-atherosclerotic effects in apolipoprotein E-deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice fed an atherogenic diet from 6 weeks of age. Daily s.c. injections of EP 80317 (300 µg/kg) or vehicle were initiated at 6-, 10-, 12- or 14-weeks until sacrifice at 18 weeks. En face analyses of the entire aortic tree revealed a striking reduction (up to 51%) of lesion areas in EP 80317-treated apoE<sup>-/-</sup> mice compared to controls. Chronic treatment with EP 80317 (12 weeks) is also associated with a 30% decrease in total plasma cholesterol, suggesting potential effects of this drug on cholesterol metabolism at the intestine/hepatic levels. EP 80317 exerts both preventive and curative effects on atherosclerotic lesion progression that were shown to be reversible after cessation of treatment. At the macrophage level, EP 80317 reduced oxLDL internalization and up-regulated genes involved in cholesterol efflux including peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), liver x receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) and the ATP-binding cassette (ABC) transporters, ABCA1 and ABCG1, supporting a role in regulating peripheral cholesterol trafficking. Importantly, the effects of EP 80317 were shown to be CD36-dependent, inasmuch as no anti-atherosclerotic or hypocholesterolemic effects were observed in apoE/CD36 double-deficient mice. In addition, long-term treatment of apoE/CD36 double-deficient mice with EP 80317 did not modulate the expression of genes of the PPAR $\gamma$  - LXR $\alpha$  - ABC transporters pathway. Our results suggest that EP

80317, as a CD36 ligand, might be a prototype for a novel class of anti-atherosclerotic agents.

## INTRODUCTION

Atherosclerosis, a progressive disease characterized by the accumulation of lipids and fibrous elements in large arteries, remains the primary cause of morbidity and mortality associated with cerebral and coronary artery diseases in industrialized countries (1). A critical step in lesion initiation is the formation of cholesterol-laden foam cells secondary to the uptake of oxidized low density lipoproteins (oxLDL) by macrophages in the subendothelial space of the artery wall (2).

Oxidized fatty acids and oxysterols, generated as a result of oxLDL uptake by macrophages, act as ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and liver x receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) nuclear receptors which regulate the expression of genes critical to the metabolism of lipoprotein and cholesterol, as well as hepatic cholesterol catabolism and intestinal sterol absorption (3-5). A key molecular membrane protein regulated via the PPAR $\gamma$  signaling pathway that may be potentially attractive as a therapeutic target for atherosclerosis is CD36, a type B scavenger receptor (SR) largely involved in the uptake of oxidatively modified LDL (6). However, besides oxLDL, CD36 binds various ligands including anionic phospholipids, apoptotic cells, effete photoreceptors, fibril  $\beta$ -amyloid deposits and Plasmodium falciparum-infected erythrocytes, which are most likely associated with its scavenging function (7). Additional ligands such as fatty acids and thrombospondins were also described, with implications for fatty acid, glucose and lipoprotein metabolism, as well as for pro-apoptotic, anti-angiogenic effects on microvascular endothelium in response to thrombospondin-1 (TSP-1). Interestingly, PPAR $\gamma$  agonists such as thiazolidinediones appear to exert overall beneficial anti-atherosclerotic effects through activation of the

PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ATP binding cassette (ABC) transporters pathway, despite an upregulation of CD36 expression on macrophages (8-10). Indeed, upregulation of LXR target genes such as ABCA1 and ABCG1 has been associated with prevention of excessive cholesterol storage and foam cell formation secondary to an increase in efflux to extracellular acceptors, mainly apoAI and HDL, for reverse transport to the liver (11-15).

In the present study, we took advantage of our recent observation that growth hormone-releasing peptides (GHRPs) serve as ligands for CD36 (16) to investigate their effect on atherosclerosis progression in a well-characterized genetic murine model of atherosclerosis. GHRPs consist of small synthetic peptides derived from enkephalin that have been initially developed as growth hormone (GH) secretagogues (17;18) and shown to also exert GH-independent cardiotropic (19;20) and cardioprotective activities, improving post-ischemic cardiac dysfunction in animal models (21-27). The identification of CD36 as a GHRP binding site in the heart suggested a role for CD36 in the cardioprotective effects afforded by GHRPs (28).

EP 80317, a synthetic hexapeptide GHRP analog that is devoided of somatotroph activity as a consequence of the presence of a Lys in position 3 (17), has been selected as a potential anti-atherogenic drug prototype. Our results show that a prolonged (4-12 weeks) treatment with EP 80317 in apoE-deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice fed a high fat, high cholesterol (HFHC) diet elicits a significant reduction in aortic lesion areas that was associated with a favorable plasma lipid profile. These pharmacologic effects were shown to be CD36-dependent and reversible upon cessation of the treatment. We also

show the ability of EP 80317 to interfere with oxLDL internalization and to modulate the expression of the PPAR $\gamma$  - LXR $\alpha$  - ABC transporters (ABCA1 and ABCG1) signaling pathways in macrophages, suggesting a role in the regulation of cholesterol efflux from macrophages. These observations may explain, at least in part, the protection against atherosclerosis afforded by this GHRP.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Mice and diets**

The apoE<sup>-/-</sup> mice, CD36-deficient (CD36<sup>-/-</sup>) mice and apoE/CD36 double-deficient (apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup>) mice were obtained as previously described (6). Six-week-old male mice were fed a HFHC diet (D12108, cholate-free AIN-76A semi-purified diet, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ) containing 40% wt/wt fat and 1.25% wt/wt cholesterol and water ad libitum. Pharmacological treatment with EP 80317 (300  $\mu$ g/kg) or vehicle (0.9% NaCl) was administered by daily s.c. injections starting at 6 weeks of age (n = 6 mice per group). In additional experiments, EP 80317 treatment was initiated 4, 6 or 8 weeks after initiation of the atherogenic diet (n= 5 mice per group). All experimental procedures were done in accordance with the Institutional Animal Ethics Committee and the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals.

**Morphometric analysis of aortic lesions and histology**

Aortas were opened longitudinally from the heart to the iliac arteries, and the lesions were stained with oil red-O, as described previously (6). En face aortic lesion areas were digitized by videomicroscopy and analyzed using Adobe Photoshop software, and expressed as the percentage of the total aortic surface area covered by lesions. For histological staining, aortas were cut into 3 equal segments and fixed in 10% formalin PBS-buffered solution and processed for standard histological procedures and embedded in paraffin. Representative sections of 6  $\mu\text{m}$  were obtained by microtome along the length of the specimen. Sections were deparaffinized in xylene and ethanol baths and stained with Verhoeff's elastic solutions to delineate external and internal elastic laminae and endoluminal atherosclerotic lesions.

**Plasma lipids analysis**

Total plasma cholesterol was assayed using the kit Infinity TM (Thermo Electron Corporation, Louisville, CO). Triglycerides and HDL cholesterol were measured using commercially available kits (Sigma, St-Louis, MO).

**Lipoproteins oxidation**

LDL from human plasma (Intracel, Frederick, MD) was dialyzed against PBS prior to oxidation with 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  for 2 h. The extent of LDL oxidation was assessed as previously described (29;30). The amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was between 6 and 10 nmol MDA/mg protein, corresponding to minimally oxidized preparations (31).

### **DiI-labeled oxLDL internalization in macrophages**

Analysis of 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)-oxidized LDL (Intracel, Frederick, MD) uptake was performed as described by Whitman et al (32) with minor modifications. Briefly, DiI-oxLDL (5 µg/ml) cell binding (4°C) and association (37°C) were measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis after 2 hours of incubation in DMEM containing 10% lipoprotein-deficient fetal bovine serum (Intracel, Frederick, MD). DiI-oxLDL internalization was calculated by subtracting the mean fluorescence intensity at 4°C from that at 37°C. Values are expressed as the percentage of macrophages harvested from 0.9% NaCl-treated mice.

### **RT-PCR and Western blot of CD36, SRA, PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , ABCA1 and ABCG1 in peritoneal macrophages**

Total cellular RNA was isolated from peritoneal macrophages of apoE<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice treated with the drug *in vivo*. RNeasy mini-kit was used according to the manufacturer's instructions (Qiagen) and total RNA (400 ng) was reverse transcribed in a total volume of 20 µl with oligo(dT) primers at 42°C for 50 min using SuperScript II RT (Invitrogen). PCR amplification was then performed in a volume of 50 µl with 1-2 µl of reverse transcription reaction and 0.4 µM of each specific primer using Taq polymerase. Cycling conditions were usually for 25-35 cycles at 94°C for 30 sec; 55°C for 45 sec, and 72°C for 30 sec. The murine primer sequences and the expected product size were as follows:

PPAR $\alpha$ , sense primer 5' - GCAAACCTTGGACTTGAACGACC - 3',

antisense primer 5' - ATGTCACAGAACGGCTTCCTCAGG-3' (170 bp);

PPAR $\gamma$ , sense primer: 5' – TGACAGGAAAGACAACGGACAA - 3',

antisense primer: 5' - ATTCAAATCAAGGTTAATGAAA - 3' (227 bp);

LXR $\alpha$ , sense primer 5' – TGAAGCGGCAAGAAGAGGAACA - 3',

antisense primer 5' - GATGGCAATGAGCAGAGCAAAC - 3' (551 bp);

ABCA1, sense primer 5' – CCAGTAACTACAGTGGCGGCAA - 3',

antisense primer 5' - TCTTCTATGTGGAGTCGCTTTT - 3' (490 bp);

ABCG1, sense primer 5' – GCAATGACGGAGCCCAAGTCC - 3',

antisense primer 5' - GAGTGTGGACTTCCCAGCTCC - 3' (320 bp);

CD36, sense primer 5' – GATGACGTGGCAAAGAACAG - 3',

antisense primer 5' – AAAGGAGGCTGCGTCTGTG - 3' (543 bp);

SR-A, sense primer 5' - CCTTGATTTCGTCAGTCCAGGAAC - 3',

antisense primer 5' - GTTGCTTTGCTGTAGATTCACGG- 3' (144 bp).

All values were normalized against GAPDH,

sense primer: 5'-CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3',

antisense primer 5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCGC-3' (129 bp).

The CD36 primers used for RT-PCR were downstream of the targeted site in exon 3 (33). PCR products were separated on 2% agarose gel, and the relative signal intensity was measured with an image analyzer (Alpha Imager, Alpha Innotech, San Leandro, CA).

For western blot analysis, total macrophage cell lysates (40-80  $\mu$ g) were subjected to SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA).



After blocking in 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6) containing 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20 and 5% (wt/vol) non fat dry milk, membranes were probed with specific polyclonal antibodies against PPAR $\gamma$  (SC-7196, Santa Cruz, Santa Cruz, CA), LXR $\alpha$  (SC-13068), ABCG1 (SC-11150), and ABCA1 (#07-358, Upstate Biotechnology, Waltham, MA), respectively. CD36 was probed with an affinity purified polyclonal IgG generated in house (16). Actin was probed with monoclonal IgG (A 5316) from Sigma (St Louis, MO). Signals were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit antibodies from KPL (Guilford, UK) or Pierce (Rockford, Il), and enhanced chemiluminescence kit (Pierce, Rockford, Il). Protein bands were quantified by densitometry using the AlphaEaseFC<sup>TM</sup> software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Rat brain, dog spleen and wild type mouse heart membranes were used as positive controls for ABCA1, ABCG1 and CD36 respectively, whereas MCF7 cell membranes and rat liver (nuclear fraction) membranes were used as positive controls for PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha$ , respectively. Macrophage membranes from CD36-deficient mice were used as negative controls for CD36 and HEK-293 cell membranes for PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , ABCA1 and ABCG1, respectively.

### **Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed using a one-way ANOVA followed by pair-wise multiple comparisons using the Student-Newman-Keuls method. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### **EP 80317 prevents atherosclerosis development in apoE<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet**

To investigate whether EP 80317 exerts anti-atherosclerotic effects, we initiated studies in apoE<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet from 6 weeks of age and treated daily with s.c. injections of the drug for a period of 12 weeks. Figure 1A shows the entire longitudinal aorta exhibiting positive oil red-O lesions staining under light microscopy. The mean lesion areas in the treated group were reduced by 51% as compared to the 0.9% NaCl-treated group ( $P < 0.01$ ) (Fig 1B). Figure 1C shows lesions and cholesterol deposition protruding into the lumen at lesion-prone sites in 0.9% NaCl-treated mice. In contrast, a significant reduction (up to 61%) in plaque surface area was observed in EP 80317-treated apoE<sup>-/-</sup> mice (Fig 1C). To determine whether EP 80317 improved lipid profile, we measured plasma lipid levels in each group (Fig. 1D). ApoE<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet for 12 weeks showed elevated total plasma cholesterol levels,  $28.4 \pm 1.3$  versus  $12.7 \pm 0.8$  mmol/L in apoE<sup>-/-</sup> mice fed normal chow (data not shown). After 12 weeks of treatment, the atherogenic diet-induced elevation in total plasma cholesterol levels was reduced by 30% in EP 80317-treated mice as compared to 0.9% NaCl-treated mice (Fig. 1D). Neither HDL cholesterol, nor triglyceride levels were significantly modulated. The body weights and food intake did not differ significantly between the vehicle and treated groups during the last week of the study period, as shown in Fig. 1E. There were no noticeable lesions in the parenchyma of different organs including the liver, pancreas and spleen of treated mice (data not shown).

### **The anti-atherosclerotic properties of EP 80317 are CD36-dependent**

To elucidate the role of CD36 in mediating the effect of CD36, apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice were fed a HFHC diet from 6 weeks of age and treated with 0.9% NaCl or EP 80317 as described above. The percentage of aortic lesion areas were 80% lower in apoE/CD36 double-deficient mice than in apoE<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2B and 1B), as reported previously (6). EP 80317 did not inhibit lesion development or change plasma lipids in these mice (Fig. 2C). In addition, EP 80317 did not modulate the expression of genes including SRA, LXR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , ABCA1 and ABCG1 in peritoneal macrophages from apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice (Fig 2D). These results support a role for CD36 in mediating the anti-atherogenic effects of EP 80317.

### **EP 80317 shows curative effects in reducing atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet**

In the next series of experiments, we investigated the potential inhibitory effect of EP 80317 on atherosclerotic lesion progression. Treatment was delayed by 4, 6 or 8 weeks after the start of the HFHC diet and continued until the mice were 18 weeks of age. EP 80317 limited lesion progression (Fig. 3A and B) inasmuch as the percentage of total aortic lesion areas was reduced by 39% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ) and 31% ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ) following initiation of treatment at 10 and 12 weeks of age in apoE<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet from 6 weeks of age, respectively. A similar trend was observed when EP 80317 treatment was delayed until the mice were 14 weeks old, thereby reducing the treatment period to 4 weeks (Fig. 3A and B). In contrast to the hypocholesterolemic effect of EP 80317 associated with a chronic and preventive treatment regimen of the peptide, total

plasma cholesterol levels were modestly reduced or unchanged when drug administration was delayed by 4-8 weeks after initiating the HFHC diet. Neither HDL cholesterol, nor triglyceride levels were significantly modulated.

### **The anti-atherosclerotic effects of EP 80317 are reversible**

To document the reversibility of the anti-atherosclerotic effects of EP 80317, apoE<sup>-/-</sup> mice were fed a HFHC diet and treated with EP 80317 from 6- to 14 weeks of age, after which the treatment was stopped. Mice were sacrificed at 22 weeks of age. As shown in Fig. 4A and 4B, the percentage of total aortic lesion areas was similar in both control and treated mice 8 weeks after cessation of treatment with EP 80317. In a similar manner, total plasma cholesterol returned to the levels observed for the vehicle-treated group (Fig. 4C).

### **EP 80317 reduces oxLDL internalization and regulates the PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA1 pathway in macrophages**

The early stages of atherosclerotic lesions development rely largely on the subendothelial accumulation of monocytes/macrophages and their differentiation into macrophage foam cells. To investigate whether EP 80317 treatment leads to reduced intracellular levels of oxLDL, peritoneal macrophages from apoE<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet and treated with EP 80317 for 12 weeks were harvested and exposed to DiI-oxLDL for 2 h (Fig. 5A). The percentage of mean fluorescence intensity, expressed as a percentage of 0.9% NaCl controls, was found to be reduced by  $21 \pm 3\%$  in mice treated with EP 80317.

To further elucidate the role of EP 80317 in the regulation of cholesterol efflux within macrophages, we assessed the effects of long-term treatment (12 weeks) on the expression of components of the PPAR $\gamma$  - LXR $\alpha$  - ABC transporters pathway. Our results show that in the absence of exposure to exogenous oxLDL, EP 80317 (300  $\mu$ g/kg per day) elicits a significant increase in mRNA expression (2-fold) of targeted genes including LXR $\alpha$  and ABCG1, whereas PPAR $\gamma$  and ABCA1 gene expression were modestly increased (1.4-fold) (Fig. 5B, right panel). The modulation of targeted genes appears to be specific inasmuch as there was no significant change in PPAR $\alpha$  or SRA mRNA expression. However, the combined exposure to both exogenous oxLDL and EP 80317 treatment induced a higher expression of the transcription factors PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha$  (2.5-3-fold) and of ABC transporters (2.5-2.6-fold) (Fig. 5B, left panel). The increase in gene expression was paralleled with an increase in protein expression of PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha$  (1.4-2.8-fold) and of ABC transporters (1.4-fold) (Fig. 5C). Despite an apparent increase in CD36 mRNA levels (1.5-1.9-fold), CD36 protein levels were not significantly increased in peritoneal macrophages harvested from EP 80317-pretreated mice, as assessed by western blot.

## DISCUSSION

The earliest observable pathologic lesions of atherosclerosis are fatty streaks, occurring as a result of the accumulation of lipid-laden macrophages in the intima of the vessel wall following scavenging of oxidized lipoproteins. In addition to macrophage foam cells, lesion progression is associated with the accumulation of T lymphocytes and smooth muscle cells in varying proportions within the lesions (34). The discovery of a

key role for the scavenger receptor CD36 in the early uptake of modified lipoproteins, and of its protective role in limiting lesion progression in an atherosclerotic mouse model suggested that CD36 might be a novel molecular target for the treatment of atherosclerosis (6;35;36).

Our recent findings identified CD36 as a binding site for GHRP analogs (16). In the heart, binding of CD36 appears to account for the cardioprotective effects of GHRPs (28). This observation, in addition to the presence of CD36 in a number of tissues and cell types involved in atherosclerosis pathogenesis including macrophages and platelets, as well as the overlap between oxLDL and GHRP binding site on CD36 (37), have prompted us to investigate whether GHRPs might exert beneficial effects on atherosclerotic lesion development. The EP 80317 compound was selected as a drug prototype mainly due to the absence of potentially interfering GH-secreting properties, as well as for its potent *in vitro* binding properties to CD36 (37).

In the present study, we show the atheroprotective effect of EP 80317 as a selective CD36 ligand in apoE<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet, a model known to mimic the progressive series of atherogenic events as seen in humans (38). A prolonged (12 weeks) administration of the peptide, initiated before the induction of aortic lesions in mice fed an atherogenic diet, prevented lesion formation by 51% (Fig. 1A and B). In contrast, the same therapeutic regimen in apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice did not significantly modulate lesion areas (Fig. 2A and B). In agreement with results published previously (6), knocking out CD36 gene in apoE<sup>-/-</sup> mice afforded a striking protection on lesion formation, as seen by an 80% reduction in total aortic tree lesion area compared to apoE<sup>-/-</sup> mice. In addition,

chronic treatment with the selective GHS-R1a endogenous peptide ghrelin did not exert significant beneficial anti-atherosclerotic effects in hypercholesterolemic mice (Harb et al., unpublished results). Altogether, these results suggest that the anti-atherosclerotic properties of EP 80317 are CD36-dependent.

Chronic (12 weeks) treatment with EP 80317 was associated with a 30% reduction in total plasma cholesterol which may contribute to the striking inhibitory effect of the drug on atherosclerotic lesion development. However, shorter periods of treatment, initiated 4 to 8 weeks after introducing the HFHC diet, were associated with lower (~20%) or no hypocholesterolemic effect, yet the reduction in lesion areas was substantial (31-39%) (Fig 3A and 3C). Hence, these results suggest that in addition to an hypocholesterolemic effect, additional mechanisms may also significantly contribute to the anti-atherosclerotic properties of EP 80317.

The protective role of LXR ligands in atherogenesis has been recently documented in bone marrow transplants atherosclerotic mouse models (39;40), and their beneficial effect appears to be largely due to an increase in LXR target genes such as ABCA1 and ABCG1 (13-15). It is thus interesting that EP 80317 treatment, by itself or associated with an exogenous administration of oxLDL, promotes gene and protein expression of LXR $\alpha$  and of the ABC transporter gene target ABCG1 and, to a lesser degree in unprimed cells, of ABCA1 (Fig. 5B and C). In addition, it has been reported that PPAR $\gamma$  activation is beneficial in the atherosclerotic setting, inasmuch as the cholesterol efflux pathways are stimulated through an increase in LXR $\alpha$ , a target PPAR $\gamma$  gene, which may offset the potentially adverse effect PPAR $\gamma$  agonists in upregulating CD36 expression (8-10). In the present study, chronic treatment with EP 80317 treatment elicited modest

changes in CD36 mRNA expression within macrophages, however, total CD36 protein levels were not significantly modulated as assessed by western blots. As reported previously, it may be possible that LXR $\alpha$  stimulation provides an escape pathway from the auto-regulatory positive feedback that normally occurs between PPAR $\gamma$  and CD36 (5;11;41). This may provide an interesting potential for GHRPs to regulate PPAR-dependent activation pathways towards LXR $\alpha$  and subsequently ABC transporters, without significantly increasing CD36 in macrophages.

Our results imply that EP 80317 modulates the transcriptional activity of nuclear receptors involved in macrophage cholesterol homeostasis. Unlike LXR $\alpha$  agonists, for which beneficial effects on macrophage efflux pathways may be counteracted by an upregulation of fatty acid synthesis and lipogenesis (8;42), EP 80317 did not modulate triglyceride levels or induce hepatic steatosis. Altogether, our results suggest that EP 80317 might interfere with the binding, as previously described (37) and internalization of oxLDL, in addition to enhancing cholesterol efflux pathway. These effects, and the lowering of total plasma cholesterol following long-term therapy might contribute, at least in part, to the beneficial effects of GHRPs in plaque regression. Interestingly, GHRPs and TSP-1, a known CD36 ligand, do not appear to share the same binding sites on CD36 (37), thus providing an apparent selectivity of GHRPs-mediated responses that may be directed towards oxLDL and CD36 interaction on macrophage-associated function, without affecting TSP-1-mediated effects (7). Thus, the overall benefit of the peptide on atherogenesis seems to occur with minimal effect on adipocyte and muscle fatty acid metabolism. The mechanisms through which EP 80317 regulates plasma



cholesterol levels are currently being investigated, and could potentially involve regulation of the expression of cholesterol transporters at the intestinal/hepatic levels.

Taking into account the atheroprotective effect of EP 80317 in apoE<sup>-/-</sup> mice, and not in apoE/CD36 double-deficient mice, it appears that the beneficial anti-atherosclerotic effect of GHRPs is CD36-dependent. Elucidation of the cellular and molecular effects of this peptide at different tissue levels will be needed to fully understand its beneficial potential in atherogenesis.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to Eve-Marie Charbonneau, Dominique Lauzier and Petra Pohankova for expert technical assistance. EP 80317 was a generous gift from Ardana Bioscience (Edinburgh, Scotland). This project was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 62837) and Ardana Bioscience.

## REFERENCES

1. Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241
2. Steinberg, D. (2002) Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Med.* 8, 1211-1217
3. Fitzgerald, M. L., Moore, K. J., Freeman, M. W. (2002) Nuclear hormone receptors and cholesterol trafficking: the orphans find a new home. *J.Mol.Med.* 80, 271-281
4. Walczack, R., Tontonoz, P. (2002) PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARg in the control of lipid metabolism. *J.Lipid Res.* 43, 177-186
5. Repa, J. J., Mangelsdorf, D. J. (2002) The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nature Med.* 8, 1243-1248
6. Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K., Silverstein, R. L. (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J.Clin.Invest.* 105, 1049-1056
7. Febbraio, M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J.Clin.Invest.* 108, 785-791
8. Vainio, S., Ikonen, E. (2003) Macrophage cholesterol transport: a critical player in foam cell formation. *Ann.Med.* 35, 146-155
9. Han, J., Hajjar, D. P., Zhou, X., Gotto, A. M., Jr., Nicholson, A. C. (2002) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-g-mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein. *J.Biol.Chem.* 277, 23582-23586

10. Valledor, A., Ricote, M. (2004) Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem.Pharmacol.* 67, 201-212
11. Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., Joseph, S. B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P. A., Curtiss, L. K., Evans, R. M., Tontonoz, P. (2001) A PPARgamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol.Cell.* 7, 161-171
12. Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H. B., Fruchart, J. C., Clavey, V., Staels, B. (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Med.* 7, 53-58
13. Repa, J. J., Turley, S. D., Lobaccaro, J. A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R. A., Dietschy, J. M., Mangelsdorf, D. J. (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289, 1524-1529
14. Venkateswaran, A., Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Mak, P. A., Wilpitz, D. C., Edwards, P. A., Tontonoz, P. (2000) Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97, 12097-12102
15. Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., Tall, A. R. (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *PNAS* 101, 9774-9779
16. Bodart, V., Febbraio, M., Demers, A., McNicoll, N., Pohankova, P., Perreault, A., Sejlitz, T., Escher, E., Silverstein, R. L., Lamontagne, D., Ong, H. (2002) CD36

mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart.

*Circ.Res.* 90, 844-849

17. Bowers, C. Y. (1998) Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell.Mol.Life Sci.*

54, 1316-1329

18. Locatelli, V., Torsello, A. (1997) Growth hormone secretagogues: focus on the growth hormone-releasing peptides. *Pharmacol.Res.* 36, 415-423

19. Ghigo, E., Arvat, E., Giordano, R., Broglio, F., Gianotti, L., Maccario, M., Bisi, G., Graziani, A., Papotti, M., Muccioli, G., Deghenghi, R., Camanni, F. (2001) Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans. *Endocrine* 14, 87-93

20. Bodart, V., Bouchard, J. F., McNicoll, N., Escher, E., Carriere, P., Ghigo, E., Sejlitz, T., Sirois, M. G., Lamontagne, D., Ong, H. (1999) Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ.Res.* 85, 796-802

21. De Gennaro Colonna, V., Rossoni, G., Bernareggi, M., Muller, E. E., Berti, F. (1997) Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur.J.Pharmacol.* 334, 201-207

22. MacAndrew, J. T., Ellery, S. S., Parry, M. A., Pan, L. C., Black, S. C. (2001) Efficacy of a growth hormone-releasing peptide mimetic in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Eur.J.Pharmacol.* 432, 195-202

23. Bisi, G., Podio, V., Valetto, M. R., Broglio, F., Bertuccio, G., Del Rio, G., Arvat, E., Boghen, M. F., Deghenghi, R., Muccioli, G., Ong, H., Ghigo, E. (1999) Acute cardiovascular and hormonal effects of GH and hexarelin, a synthetic GH-releasing peptide, in humans. *J.Endocrinol.Invest.* 22, 266-272

24. Locatelli, V., Rossoni, G., Schweiger, F., Torsello, A., De Gennaro Colonna, V., Bernareggi, M., Deghenghi, R., Muller, E. E., Berti, F. (1999) Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology* 140, 4024-4031
25. Rossoni, G., De Gennaro Colonna, V., Bernareggi, M., Polvani, G. L., Muller, E. E., Berti, F. (1998) Protectant activity of hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 32, 260-265
26. Tivesten, Å., Bollano, E., Caidahl, K., Kujacic, V., Sun, X. Y., Hedner, T., Hjalmarson, Å., Bengtsson, B.-Å., Isgaard, J. (2000) The growth hormone secretagogue Hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology* 141, 60-66
27. Berti, F., Rossoni, G., De Gennaro Colonna, V. (1999) Hexarelin, a synthetic growth hormone secretagogue, exhibits protectant activity in experimental myocardial ischemia and reperfusion. In *Growth hormone secretagogues* (Ghigo, E., Boghen, M., Casanueva, F. F., and Dieguez, C., eds) pp. 301-314, Elsevier Science B.V., New York.
28. Torsello, A., Bresciani, E., Rossoni, G., Avallone, R., Tulipano, G., Cocchi, D., Bulgarelli, I., Deghenghi, R., Berti, F., Locatelli, V. (2003) Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology* 144, 1787-1792
29. Quintanilha, A. T., Packer, L., Davies, J. M., Racanelli, T. L., Davies, K. J. (1982) Membrane effects of vitamin E deficiency: bioenergetic and surface density studies of skeletal muscle and liver mitochondria. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 393, 32-47

30. Maguire, G. F., Lee, M., Connelly, P. W. (1989) Sodium dodecyl sulfate-glycerol polyacrylamide slab gel electrophoresis for the resolution of apolipoproteins. *J.Lipid Res.* 30, 757-761
31. Yoshida, H., Quehenberger, O., Kondratenko, N., Green, S., Steinberg, D. (1998) Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18, 794-802
32. Whitman, S. C., Daugherty, A., Post, S. R. (2000) Regulation of acetylated low density lipoprotein uptake in macrophages by pertussis toxin-sensitive G proteins. *J.Lipid Res.* 41, 807-813
33. Febbraio, M., Abumrad, N. A., Hajjar, D. P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S. F., Silverstein, R. L. (1999) A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J.Biol.Chem.* 274, 19055-19062
34. Li, A. C., Glass, C. K. (2002) The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Med.* 8, 1235-1242
35. Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J. S., Silverstein, R., Hoff, H. F., Freeman, M. W. (2002) Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J.Biol.Chem.* 277, 49982-49988
36. Nakata, A., Nakagawa, Y., Nishida, M., Nozaki, S., Miyagawa, J., Nakagawa, T., Tamura, R., Matsumoto, K., Kameda-Takemura, K., Yamashita, S., Matsuzawa, Y. (1999) CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly

expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19, 1333-1339

37. Demers, A., McNicoll, N., Febbraio, M., Servant, M., Marleau, S., Silverstein, R., Ong, H. (2004) Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study . *Biochem.J.* 382, 417-424

38. Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., Ross, R. (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler.Thromb.* 14, 133-140

39. Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. A., Collins, A. R., Laffitte, B. A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G. N., Tran, J., Tippin, T. K., Wang, X., Lusis, A. J., Hsueh, W. A., Law, R. E., Collins, J. L., Willson, T. M., Tontonoz, P. (2002) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99, 7604-7609

40. Tangirala, R. K., Bischoff, E. D., Joseph, S. B., Wagner, B. L., Walczak, R., Laffitte, B. A., Daige, C. L., Thomas, D., Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Wang, X., Lusis, A. J., Tontonoz, P., Schulman, I. G. (2002) Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99, 11896-11901

41. Tontonoz, P., Mangelsdorf, D. J. (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol.Endocrinol.* 17, 985-993

42. Grefhorst, A., Elzinga, B. M., Voshol, P. J., Plösch, T., Kok, T., Bloks, V. W., van der Sluijs, F. H., Havekes, L. M., Romijn, J. A., Verkade, H. J., Kuipers, F. (2002) Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to

production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles.

*J.Biol.Chem.* 277, 34182-34190



## LEGENDS TO FIGURES

### **Fig. 1. Effects of long-term (12 weeks) administration of EP 80317 in apoE<sup>-/-</sup> mice.**

Representative en face oil red-O-stained aortas from apoE<sup>-/-</sup> mice fed an atherogenic diet from 6 weeks of age, and treated daily with 0.9% NaCl (top) or EP 80317 (300 µg/kg) (bottom) (A) and mean percentage of aortic lesion areas in apoE<sup>-/-</sup> mice treated with EP 80317 (*n* = 6) or vehicle (*n* = 4) (B). Representative histochemistry of aortic sections of apoE<sup>-/-</sup> mice treated with vehicle or EP 80317 (C). Total plasma cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride levels in apoE<sup>-/-</sup> mice treated with vehicle or EP 80317 (D). Mean body weight and food intake during the last week of treatment with vehicle or EP 80317 (E). Results are expressed as mean ± SEM. \*\* *P* < 0.01; \*\*\* *P* < 0.001 compared to vehicle (0.9% NaCl).

### **Fig. 2. Effects of long-term administration of EP 80317 in apoE/CD36 double-null mice.**

Representative en face oil red-O-stained aortas from apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice fed an atherogenic diet from 6 weeks of age, and treated daily with 0.9% NaCl (top) or 300 µg EP 80317/kg (bottom) (A) and mean percentage of aortic lesion areas in apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice treated with EP 80317 (*n* = 6) or vehicle (*n* = 5) (B). Total plasma cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride levels in apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice treated with vehicle or EP 80317 (C). Representative steady-state mRNA levels of CD36, SRA, PPARγ, LXRα, ABCA1, ABCG1 and GAPDH in peritoneal macrophages harvested from apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice after chronic (12 weeks) treatment with 0.9% NaCl or EP 80317 (D). Results are expressed as mean ± SEM.

**Fig. 3. Curative effects of EP 80317 in apoE<sup>-/-</sup> mice.** Representative en face oil red-O-stained aortas from apoE<sup>-/-</sup> mice fed an atherogenic diet from 6 weeks of age, and treated with either 0.9% NaCl (top) or 300 µg/kg EP 80317 from 10 to 18 weeks of age (second from top), 12 to 18 weeks of age (third from top), and 14 to 18 weeks of age (bottom), respectively (A) and mean percentage of aortic lesions for each period of treatment (B). Total plasma cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride levels in apoE<sup>-/-</sup> mice treated with vehicle or EP 80317 for the different periods, as indicated (C). Results are expressed as mean ± SEM of n = 5 mice per group. \* P < 0.05 compared to vehicle (0.9% NaCl).

**Fig. 4. Reversibility of the effect of EP 80317.** Representative en face oil red-O-stained aortas from 22-week-old apoE<sup>-/-</sup> mice fed an atherogenic diet from 6 weeks of age, and treated daily from weeks 6-14 with 0.9% NaCl (top) or 300 µg EP 80317/kg (bottom) (A) and the mean percentage of aortic lesion area after cessation of treatment (B). Results are expressed as mean ± SEM of n=5 mice in each group. Total cholesterol returned to levels observed for vehicle-treated group (C).

**Fig. 5. Effect of EP 80317 on DiI-oxLDL internalization and gene expression of scavenger receptors, nuclear receptors and ABC transporters.** DiI-oxLDL internalization in peritoneal macrophages harvested from apoE<sup>-/-</sup> mice treated daily for 12 weeks with 0.9% NaCl or EP 80317 (300 µg/kg) (A). The overlay histogram shows FACS plots of peritoneal macrophages harvested from 0.9% NaCl-treated (black line) and EP 80317-treated mice (red line) (representative from 3 experiments). Bar graph represents the percent change (± SEM) in mean fluorescence intensity over the control macrophage population set at 100%. \*\* P < 0.01 compared to macrophages from 0.9%

NaCl-treated mice. Representative steady-state mRNA levels of CD36, SR-A, PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , ABCA1, ABCG1 and GAPDH peritoneal macrophages harvested from apoE<sup>-/-</sup> mice after chronic (12 weeks) treatment with EP 80317 receiving (left panel) or not (right panel) an i.p. injection of oxLDL (250  $\mu$ g) prior to collection of macrophages. ApoE<sup>-/-</sup> mice were maintained on a HFHC diet and treated daily as in Figure 1. Immunoblots of CD36, LXR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , ABCA1 and ABCG1 expression in macrophages were performed (C). Each data set shows apoE<sup>-/-</sup> mice treated vehicle or EP 80317 as indicated. Data are representative of 2-4 independent experiments.

FIGURES

Figure 1

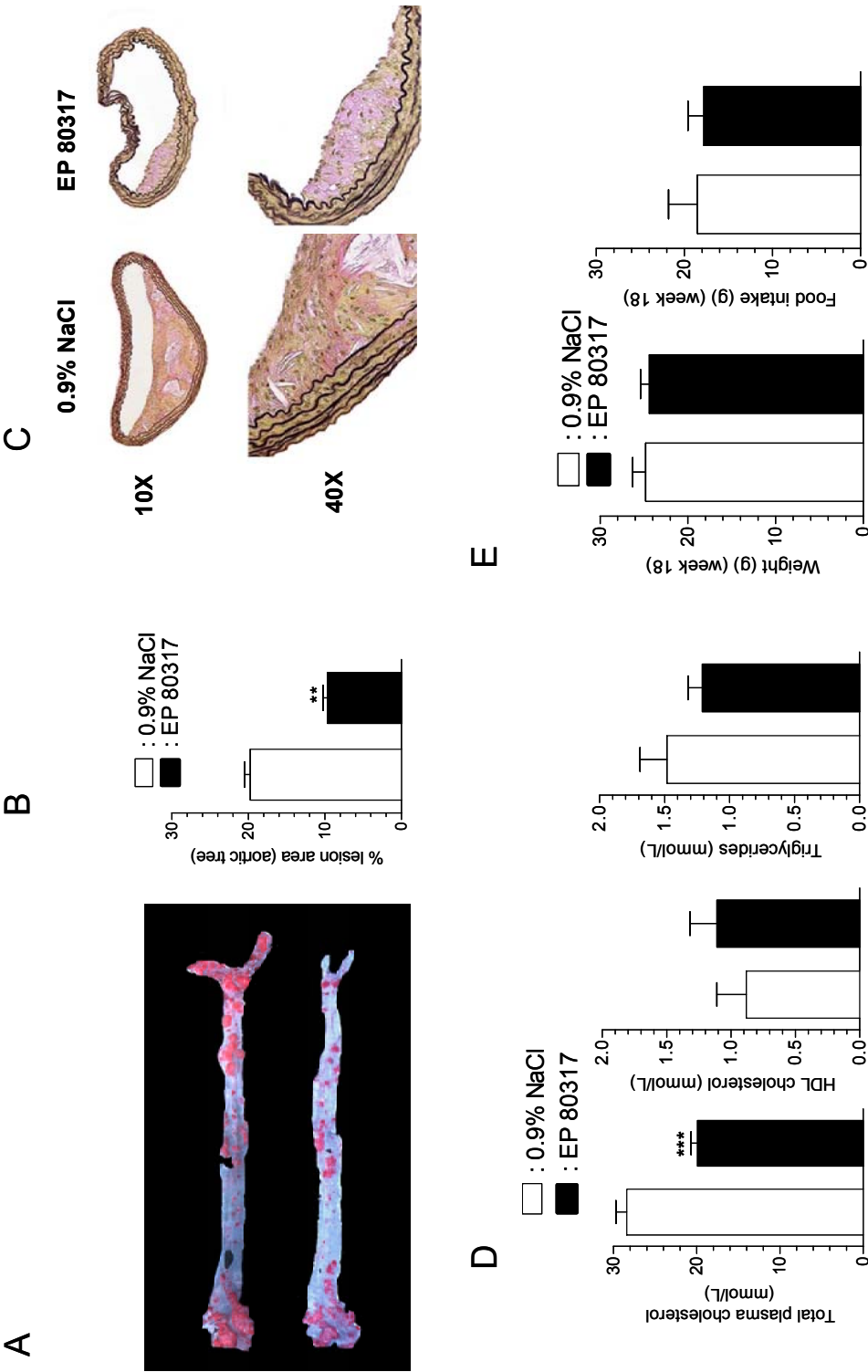


Figure 2

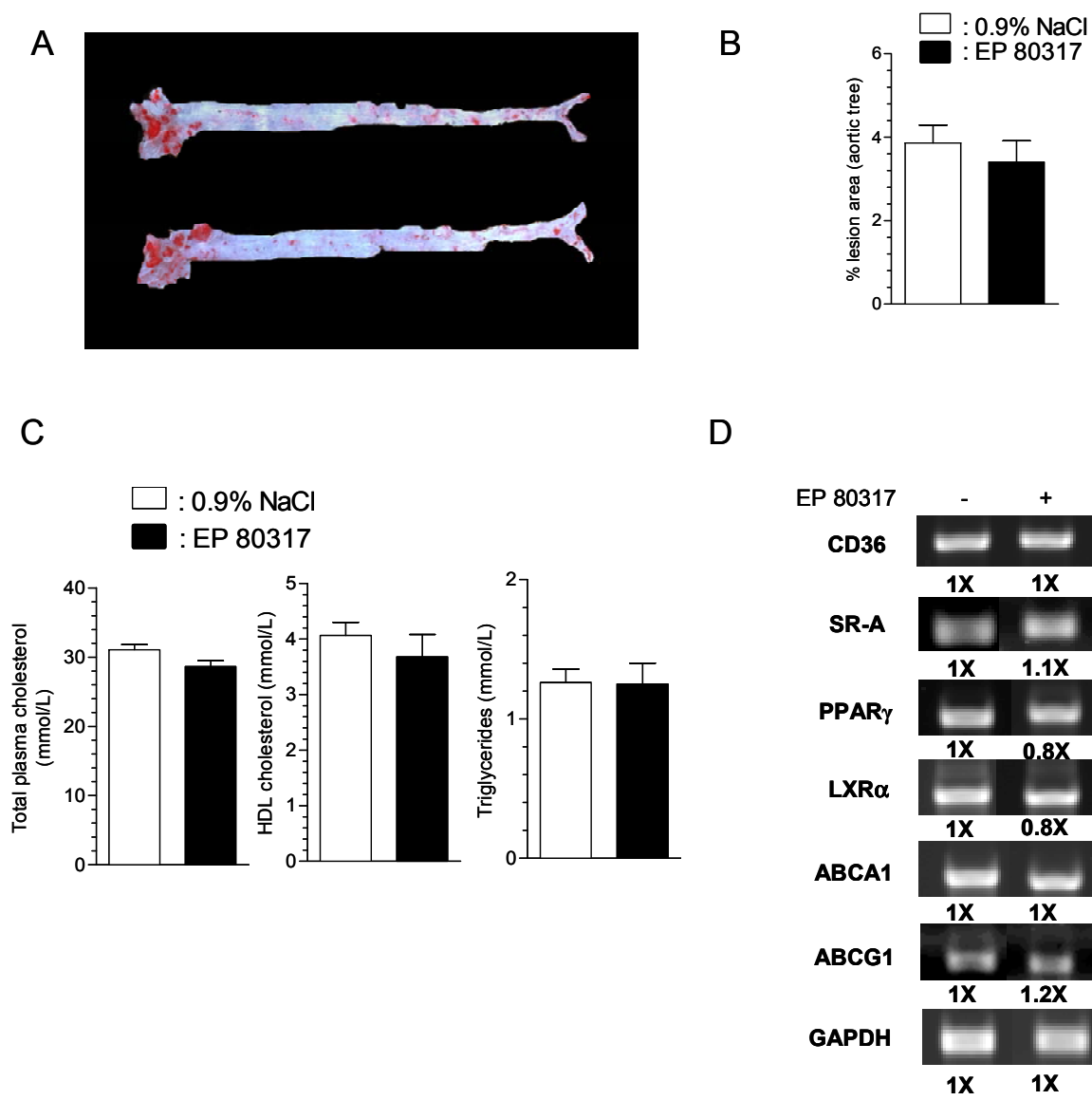


Figure 3

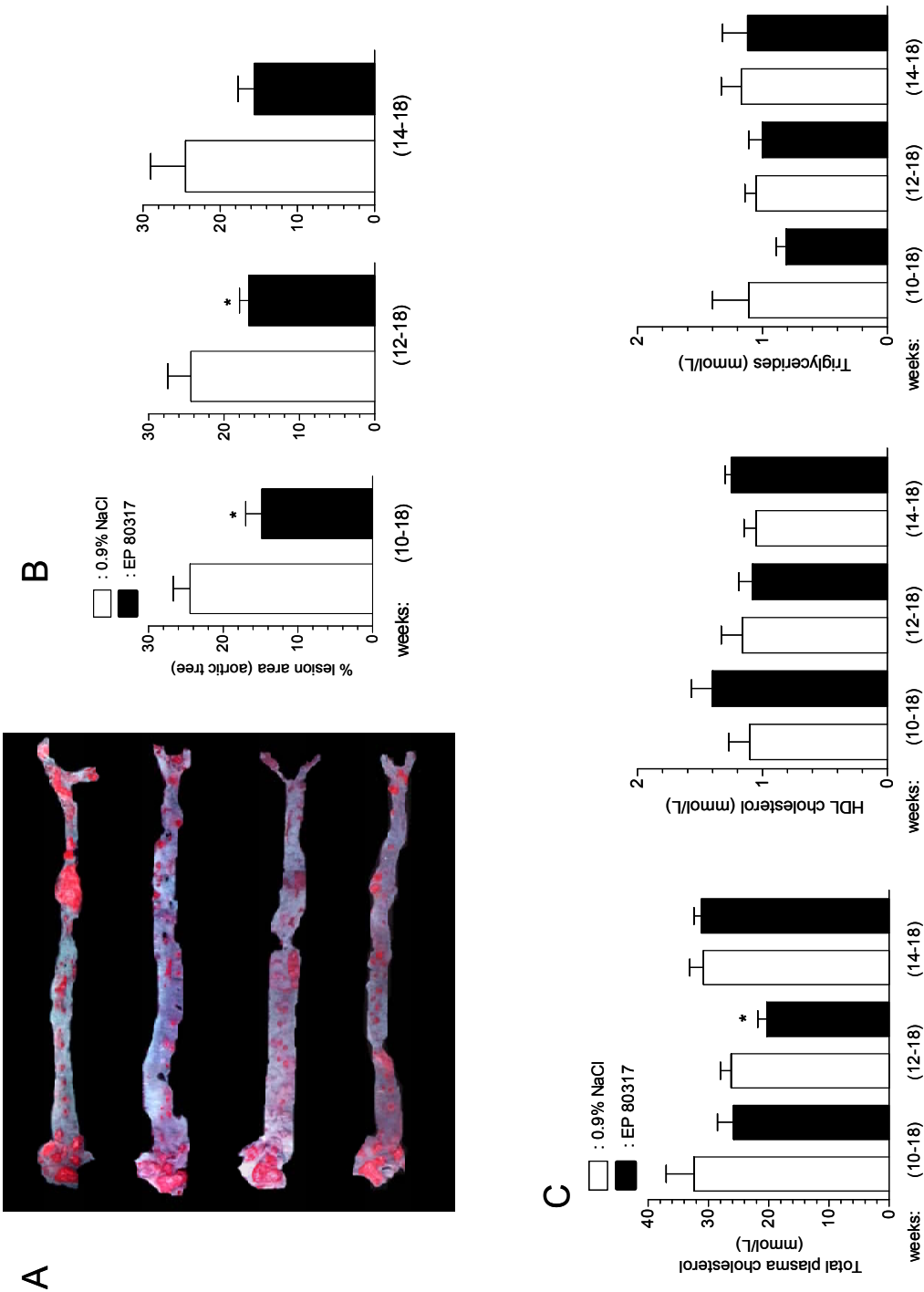


Figure 4

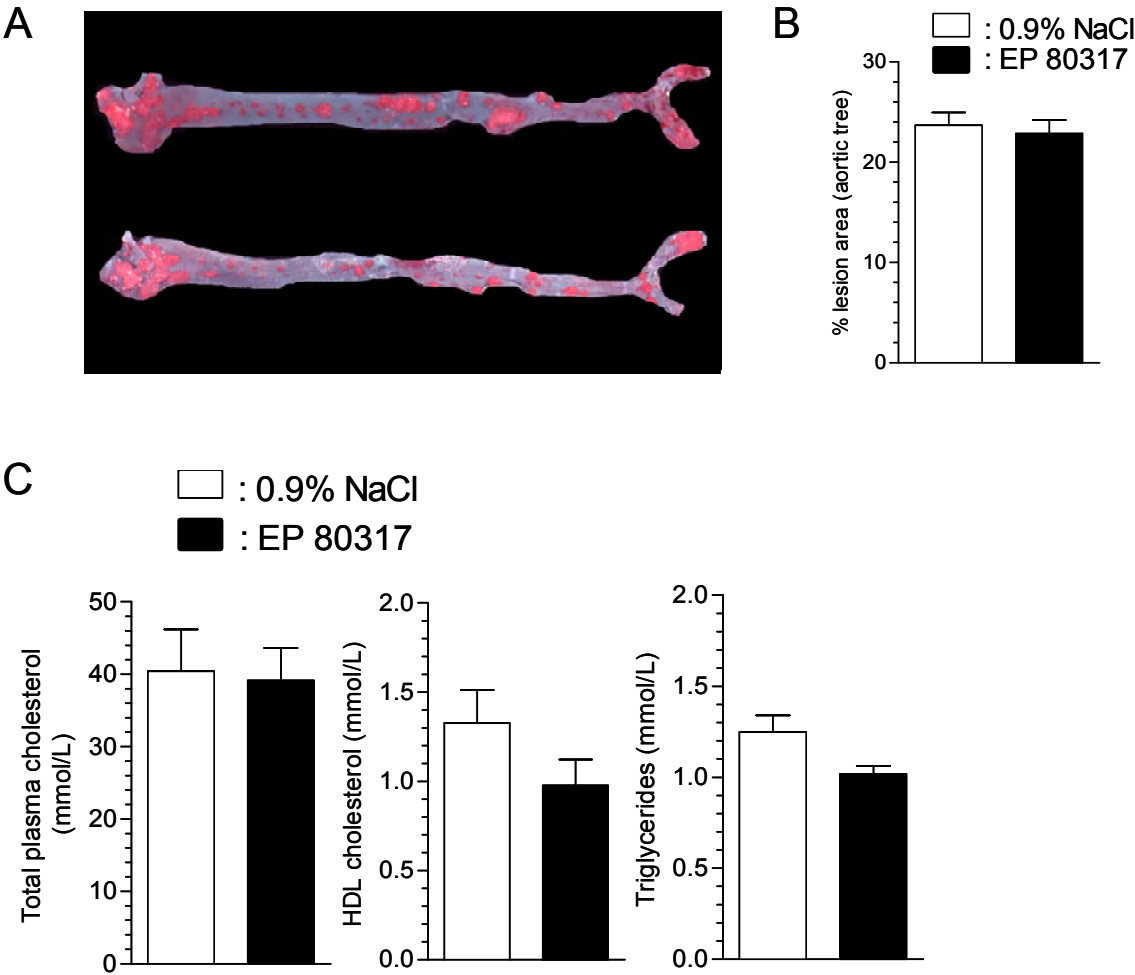
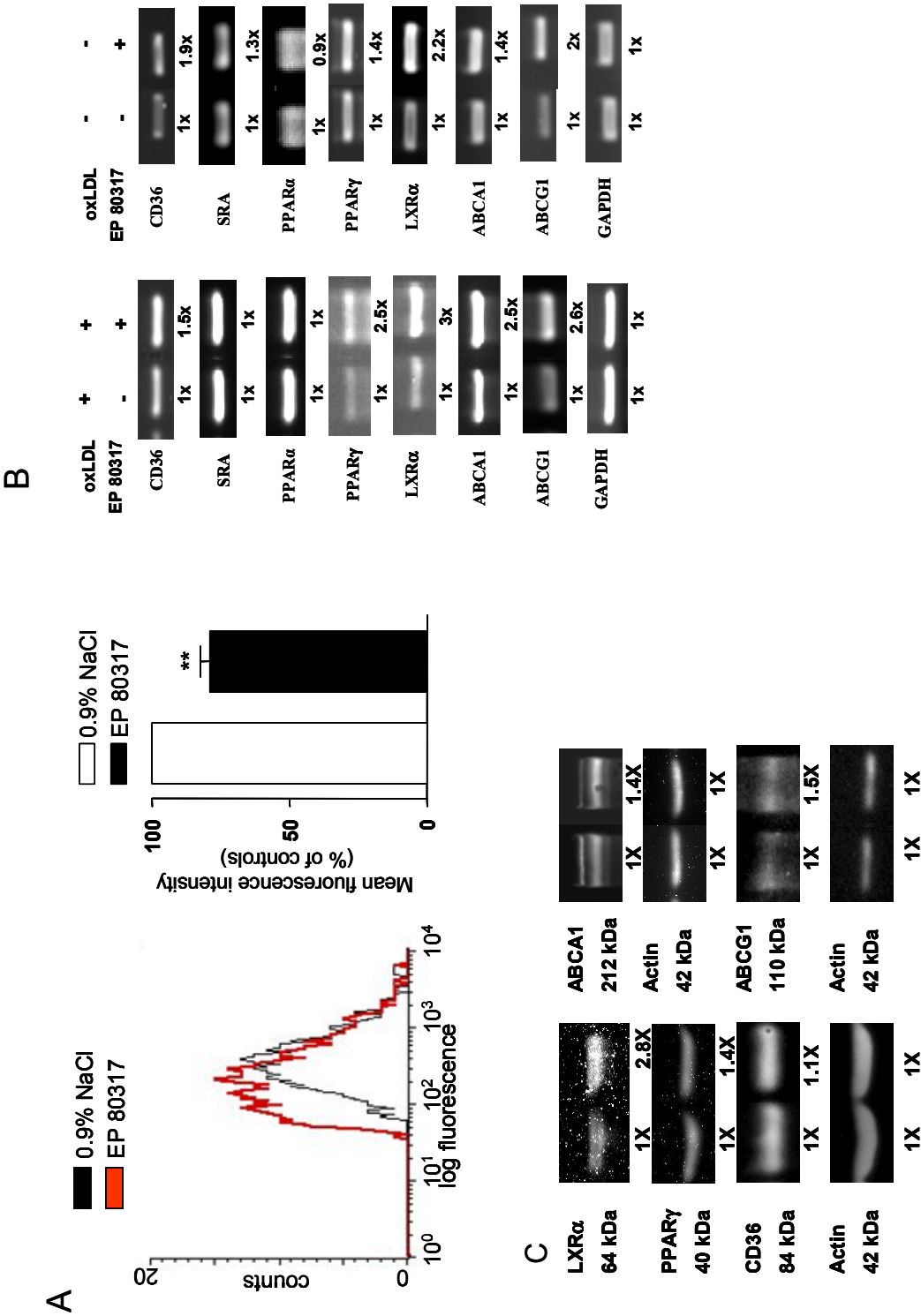


Figure 5





## **Chapitre 6**

**Le rôle du récepteur CD36 dans la régulation du recrutement des  
phagocytes mononucléés au niveau des lésions athérosclérotiques et  
dans l'inflammation vasculaire**

## 6.1. Avant-propos

Le recrutement des monocytes en circulation dans l'espace vasculaire joue un rôle crucial dans le développement et la progression de l'athérosclérose (Braunersreuther and Mach, 2006; Soehnlein and Weber, 2009). Les monocytes ayant migré dans l'espace sous-endothélial se différencient en macrophages qui constituent une source riche en cytokines, ROS et métalloprotéinases qui intensifient l'inflammation vasculaire et dégradent la matrice extracellulaire, contribuant ainsi à la rupture des plaques athérosclérotiques (Saha et al., 2009; Bobryshev, 2006; Østrud and Bjorklid, 2003). La migration des monocytes à travers l'endothélium vasculaire est régulée par différents facteurs qui agissent de manière concomitante ou séquentielle pour réguler l'extravasation des leucocytes dans l'intima (Cybulsky et al., 2004; Eriksson, 2004). Parmi les facteurs les plus décrits, notons l'implication des molécules d'adhérence induites au niveau des cellules endothéliales telles que VCAM-1 (Galkina and Ley, 2007; Blankenberg et al., 2003), les agents chimiotactiques dont la chimiokine CCL2 (Zernecke et al., 2008; Sheikine and Hansson, 2004), les ROS produits par les différentes enzymes oxydantes au niveau vasculaire dont la NADPHox et iNOS (Saha et al., 2009; Stocker and Kearney, 2004) et les LDLox (Fan and Watanabe, 2003; Leitinger, 2003; Poli et al., 2009; Stocker and Kearney, 2004). Les effets pro-inflammatoires des phospholipides oxydés dérivés du LDLox sur la régulation du recrutement des leucocytes circulants ont aussi été documentés au niveau vasculaire (Leitinger, 2005; Berliner et al., 2008). Cependant, très peu d'études se sont attardées à examiner un effet direct induit du LDLox ou des PLox envers les phagocytes mononucléés circulants, et encore moins à étudier le récepteur impliqué dans ces effets (Quinn et al., 1987; Mine et

al., 2002; Kuchibhotla et al., 2008). Notons qu'en réponse au LDLox, le CD36 exprimé au niveau des microglies active une voie de signalisation impliquant p130Cas, les kinases Src, la kinase des points de contact focaux Pyk2 et la protéine adaptatrice du cytosquelette paxilline (Stuart et al., 2007).

## **6.2. Hypothèse de recherche**

Étant donné que Pyk2 est une kinase des podosomes dont l'activation est cruciale dans la régulation de la migration des phagocytes mononucléés (Duong et al., 2000; Okigaki et al., 2003; Mitra et al., 2005; Baruzzi et al., 2008), nous avons voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle le CD36, activé par les phospholipides oxydés, contribue au recrutement des monocytes en circulation au niveau des lésions athérosclérotiques par régulation de l'activation de Pyk2.

## **6.3. Objectifs**

Notre deuxième publication avait pour objectif principal d'élucider certains des mécanismes d'action moléculaires à l'origine des effets anti-athérosclérotiques des ligands synthétiques du CD36, plus précisément les effets anti-inflammatoires vasculaire et systémique. Dans cette étude nous nous sommes penchés sur les mécanismes impliqués dans la chimiotaxie des phagocytes mononucléés en répondant aux questions suivantes:

- Quel est le rôle du CD36 dans le recrutement des phagocytes mononucléés au niveau des lésions athérosclérotiques?

- Quel est le rôle des kinases Src et Pyk2 dans la régulation de la migration des leucocytes sanguins?
- Quel est l'effet du traitement pharmacologique par le EP 80317 sur la réponse inflammatoire vasculaire?

Pour répondre à ces questions, des approches pharmacologique (EP 80317) et génétique (souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup>) ont été utilisées.

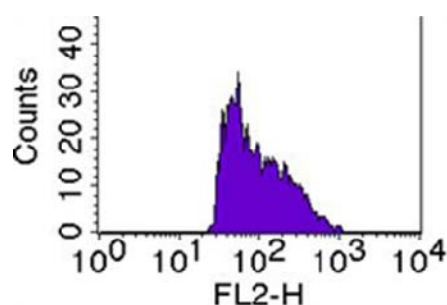
#### 6.4. Méthodes

Afin d'investiguer le rôle du CD36 dans la régulation de la migration des phagocytes mononucléés *in vivo*, nous avons injecté par voie intraveineuse des macrophages péritonéaux de souris radiomarqués à l'indium-111 (In<sup>111</sup>) exprimant ou non le récepteur CD36, et quantifié leur accumulation au niveau des lésions athérosclérotiques. D'une part, les macrophages récoltés au niveau de la cavité péritonéale ont été utilisés dans la littérature pour étudier la migration des phagocytes mononucléés au niveau des sites inflammatoires *in vivo* (Chokri et al., 1990; Rosen et al, 1990; Audran et al, 1995). D'autre part, le marquage à l'In<sup>111</sup> offre certains avantages par rapport à d'autres isotopes tels que le chrome-51, dont une courte durée d'incubation (~15 minutes) à température ambiante (Faccioli et al., 1991; McAfee, 1984). De plus, la complexation de l'In<sup>111</sup> au N-oxyde-2-mercaptopyridine confère une lipophilicité et une internalisation accrues et une activité spécifique élevée aux cellules radiomarquées. Nous avons utilisé les macrophages péritonéaux «résidents», donc non induits par un stimulus inflammatoire, comme modèle de phagocytes mononucléés. D'autres groupes ont montré que ces macrophages sont capables de migrer *in vivo* et de s'accumuler au

niveau des sites inflammatoires (Chokri et al., 1990; Rosen et al., 1990; Audran et al., 1995) et que ces cellules constituent une alternative à l'utilisation des monocytes sanguins, plus difficiles à purifier en quantité suffisante pour les études expérimentales de chimiotaxie *in vivo* (Rosen et al., 1990; Audran et al., 1995). L'utilisation de macrophages résidents est favorable à celle des macrophages recrutés après l'injection du thioglycolate, en ce sens que ces derniers libèrent 12 fois plus d'anion superoxyde, présentent une motilité altérée (Cohn et al., 1978; Shaw et al., 1982) et montrent une augmentation de l'expression des récepteurs éboueurs (Ramprasad, 1996; de Winther, 1999) et de certaines protéines qui modulent l'expression membranaire du CD36 telles que le PPAR $\gamma$  (Ricote et al., 1998) et les cavéoles (Kiss et al., 2002).

Des études mécanistiques ont été réalisées *in vitro* en utilisant la lignée monocyttaire murine RAW 264.7 et des macrophages péritonéaux non stimulés (résidents) de souris. Les cellules RAW 264.7 expriment le récepteur CD36 au niveau de leur membrane plasmique, tel que démontré par microscopie confocale (Collins et al., 2009) et par cytométrie de flux (Figure 22, Harb et al., données non publiées) et conservent cette expression durant les différents passages (Harb et al., données non publiées). De plus, les cellules RAW 264.7 constituent un modèle convenable pour l'investigation de la signalisation cellulaire impliquée dans la migration cellulaire puisqu'elles expriment les kinases Src, incluant *c-Src*, *Fyn* et *Lyn* (Kumagai et al., 2004; Khadaroo et al., 2003; Suzuki et al., 2000), les kinases des podosomes, FAK et Pyk2 (Park et al., 2009; Xi et al., 2009; Miksa et al., 2007; Duong et al., 2000), les protéines du cytosquelette telles que la vinculine, la taline et la paxilline (Xi et al., 2009; Duong et al., 2000). Également, ces cellules répondent aux stimuli chimiotactiques par une polymérisation de l'actine

(Miller et al., 2003; Clahsen et al., 2008), par la formation de podosomes (Poincloux et al., 2006) ainsi que par une adhésion et une motilité accrues (Clahsen et al., 2008; Monick et al., 2002). La lignée cellulaire RAW264.7 est l'une des lignées les plus utilisées pour l'étude des monocytes/macrophages murins *in vitro*. En effet, les lignées cellulaires RAW 264.7 et J774 sont des cellules macrophagiques d'origine murine dérivées à partir des tumeurs induites chez les souris Balb/c infectées par le virus *Abelson leukemia* ou à partir des *reticulum cell sarcoma*, respectivement. Les deux lignées présentent la morphologie et la fonction des macrophages en culture cellulaire, incluant la fonction de phagocytose. Ces lignées cellulaires expriment les récepteurs éboueurs, internalisent le LDLox, se transforment en cellules spumeuses (Ricote et al., 1998; de Villiers et al., 1999; Friedl et al., 2006). Cependant, nous avons préféré l'utilisation des cellules RAW 264.7 plutôt que les cellules J774 puisque ces dernières sécrètent de manière constitutive des cytokines qui modulent le réarrangement du cytosquelette des leucocytes (Nakamura et al., 2002; Fuortes et al., 1999) dont l'IL-1 $\beta$  (Ralph et al., 1976; Shalit et al. 1997; ATCC) et le TNF $\alpha$  (Shalit et al., 1997). Notons que nos résultats observés dans les cellules RAW 264.7 ont été confirmés chez des macrophages péritonéaux résidents exprimant ou non le récepteur CD36 (Article II).



**Figure 23. Expression membranaire du CD36 par la lignée cellulaire monocyttaire RAW264.7.** Histogramme obtenu par cytométrie de flux montrant l'expression membranaire du récepteur CD36 par les cellules RAW 264.7 non stimulées (Harb et al., données non publiées).

Au niveau de la signalisation cellulaire des leucocytes, les kinases des podosomes FAK et Pyk2 sont considérées comme des éléments-clés dans la migration cellulaire puisque leur activation permet de libérer des sites de fixation pour des protéines contenant des domaines SH2, ce qui permet le recrutement de différentes protéines qui participent au remaniement du cytosquelette (Graf, Grb7, PLC- $\gamma$ ), à la formation des podosomes et des lamellipodes, à la polarité des cellules et à la régulation de la migration et de l'adhérence cellulaire (Cornillon et al., 2003; Sanchez-Madrid et al., 1999; Mitra et al., 2005). Il est important de noter que les monocytes en circulation n'expriment pas FAK (Lin et al., 1994; De Nichilo et al., 1996; Li et al., 1998; Watson et al., 2001) et que leur migration aux sites inflammatoires ou en réponse à des agents chimiotactiques dépend essentiellement de Pyk2 (Watson et al., 2001; Li et al., 1998). Étant donné que ce sont les monocytes en circulation qui migrent dans l'espace sous-endothélial au cours de l'athérosclérose, nous avons trouvé important d'étudier l'activation de la kinase Pyk2 en présence des PCoxCD36.

### **6.5. Contributions à la publication**

- Participation à l'élaboration de l'hypothèse de recherche et aux protocoles expérimentaux.
- Réalisation de la majorité des expériences *in vivo* et *in vitro*.
- Analyse / présentation graphique des expériences exécutées.
- Contribution à la rédaction de l'article.

## 6.6. Résumé

Le CD36 s'associe aux kinases Src pour activer les protéine kinases «*mitogen-activated proteins*» (MAP) et déclencher le remodelage du cytosquelette. Cependant, son rôle dans le recrutement des phagocytes mononucléés au niveau des lésions athérosclérotiques n'a pas été étudié à ce jour. **But:** Le but de la présente étude est d'étudier le rôle du CD36 dans la régulation du recrutement des monocytes au niveau aortique et dans la réponse inflammatoire associée, en utilisant des approches pharmacologique et génétique. **Méthodes et résultats:** Des souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE<sup>-/-</sup>), nourries avec une diète riche en lipides et en cholestérol, ont été traitées quotidiennement avec un ligand du CD36, le EP 80317 (300 µg/kg), ou avec le véhicule (NaCl 0.9%) pour 6 ou 12 semaines. Quarante-huit heures avant le sacrifice, les souris ont été injectées *i.v.* avec une suspension de macrophages péritonéaux radiomarqués à l'indium<sup>111</sup>. Les souris traitées avec le EP 80317 ont montré une réduction de 65% ( $P < 0.001$ ) de l'accumulation des macrophages radiomarqués au niveau des lésions aortiques, principalement au niveau de la crosse aortique et des artères iliaques. Ces résultats sont associés à une réduction de 43% des lésions athérosclérotiques et à une réduction de la phosphorylation de la kinase Pyk2 des monocytes/macrophages stimulés avec des phospholipides oxydés, de manière dépendante des kinases Src et du CD36. Au niveau vasculaire, un traitement prolongé avec le EP 80317 a réduit l'expression des protéines pro-inflammatoires dont la NADPH oxydase, la synthase inductible du monoxyde d'azote (iNOS), la molécule d'adhérence vasculaire endothéliale (VCAM-1) et la chimiokine CCL2. Les niveaux plasmatiques de l'interleukine-6 ont également été réduits de 40% ( $P < 0.05$ ). Par



contre, l'expression de ces protéines n'a pas été modulée chez les souris apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> traitées avec le EP 80317. **Conclusions:** Nos résultats appuient le rôle du CD36 dans le recrutement des phagocytes mononucléés au niveau des sites athérosclérotiques et dans l'inflammation vasculaire associée.

**The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation**

**Diala Harb<sup>1</sup>**, Kim Bujold<sup>1</sup>, Maria Febbraio<sup>3</sup>, Martin G. Sirois<sup>2</sup>, Huy Ong<sup>1,2,\*</sup> and Sylvie Marleau<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup>Department of Cell Biology, Lerner Research Institute, Cleveland, OH, USA.

Short title: CD36 regulates mononuclear phagocyte trafficking

\* Corresponding authors: Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, P.O.Box 6128, Station Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

*Reprinted from Harb et al., Cardiovasc Res. 2009. 83(1):42-51, by permission of Oxford University Press.*

## Abstract

**Aims:** CD36 has been shown to associate with non receptor Src kinases to activate mitogen-activated protein (MAP) kinases and trigger cytoskeletal remodelling, as important events in foam cell formation and macrophage migration. Yet, its role in regulating circulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions has not been investigated. The aim of the present study was to investigate the role of CD36 in modulating the recruitment of mononuclear phagocyte to the arterial wall and the associated vascular inflammation, using both pharmacological and genetic approaches.

**Methods and results:** Apolipoprotein E-deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice fed a high fat high cholesterol diet were treated daily with a CD36 ligand, EP 80317 (300 µg/kg) or 0.9% NaCl for 6 or 12 weeks. Forty-eight hours before sacrifice, mice were injected *i.v.* with <sup>111</sup>Indium-labelled macrophages. A 65% ( $P < 0.001$ ) reduction of labelled-macrophage accumulation to aortic lesions was observed in EP 80317-treated mice, mainly at the level of the aortic arch and iliac arteries, correlating with a 43% reduction of atherosclerotic lesion areas. This was associated with reduced phosphorylation of the focal adhesion kinase Pyk2 following stimulation with oxidised phospholipid, in a Src kinases- and CD36-dependent manner. At the vascular level, EP 80317 treatment reduced the expression of pro-inflammatory proteins, including NADPH oxidase, inducible nitric oxide synthase (iNOS), vascular endothelial cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and CCL2 chemokine. Plasma IL-6 levels were also reduced by 40% ( $P < 0.05$ ). In contrast, none of these proteins were modulated in EP 80317-treated apoE/CD36 double knockout (apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup>) mice.

**Conclusions:** Our results support a role for CD36 signalling in the regulation of mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic-prone sites and in the associated vascular wall inflammation.

## 1. Introduction

CD36, a multiligand class B scavenger receptor expressed by monocytes/macrophages, has been shown to be a key player in atherosclerosis development through oxidised LDL (oxLDL) binding and internalisation, thereby leading to macrophage-derived foam cell formation and to their accumulation into fatty streaks.<sup>1</sup> CD36 is also a signalling receptor, and oxLDL was shown to promote CD36 association with the non receptor Src-like protein tyrosine kinase lyn and the MAP/ERK kinase kinase 2 (MEKK2) to signal through the MAP kinases JNK1 and JNK2, as important events in foam cell formation.<sup>2</sup> In another setting, microglial cell migration in response to  $\beta$ -amyloid was associated with a CD36-dependent tyrosine phosphorylation of p130Cas, the p130Cas binding kinase Pyk2, and the cytoskeletal adaptor protein paxillin, coordinating cytoskeletal rearrangement downstream of CD36.<sup>3</sup> Yet, whether CD36 regulates mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions remains to be investigated. Along this line, a reduced chemotactic response of CD36-deficient macrophages towards the CCL2 chemokine was observed *in vitro*.<sup>4</sup>

Recruitment of circulating monocytes to atherosclerotic-prone areas is known to rely on the upregulated expression of endothelial cell adhesion molecules and pro-inflammatory mediators generated by activated monocytes/macrophages, endothelial and vascular smooth muscle cells within the arterial wall.<sup>5,6</sup> In addition to locally generated pro-inflammatory mediators, oxLDL has been reported to increase monocyte binding and transendothelial migration, leading to actin polymerization and LFA-1 integrin activation on circulating monocytes,<sup>7</sup> and to the upregulation of cell adhesion molecules

at intercellular endothelial junctions.<sup>8</sup> Mildly oxLDL-derived phospholipids, such as oxidised 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (oxPAPC) and its biologically active components, 1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (PGPC) and 1-palmytoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphorylcholine (POVPC), were also shown to increase monocyte binding to human aortic endothelial cells<sup>9</sup> and to stimulate CCL2 and CXCL8,<sup>10</sup> heme oxygenase-1 and early growth response factor-1 biosynthesis in a number of cell types or tissues.<sup>11</sup> In agreement, POVPC has been characterised as a high affinity ligand for CD36.<sup>12,13</sup> Altogether, these observations point to a potentially important role of oxidised LDL and phospholipids in regulating mononuclear phagocyte recruitment to the arterial vascular wall through CD36 signalling, cell adhesion molecules upregulation and cytokine biosynthesis.

In our previous studies we showed that EP 80317, which binds selectively to CD36 at a site overlapping that of oxLDL,<sup>14</sup> prevented apolipoprotein E (apoE)-deficient mice (apoE<sup>-/-</sup>) from developing atherosclerotic lesions.<sup>15</sup> Prolonged treatment was associated with hypocholesterolemia, reduced oxLDL uptake in macrophages along with an upregulation of signalling proteins involved in cholesterol efflux.<sup>15,16</sup> In the present study, we have addressed the role of CD36 in mononuclear phagocyte recruitment to aortic lesions and vascular wall inflammation in response to oxLDL and oxidised phospholipids, using both genetic and pharmacological approaches. <sup>111</sup>Indium (In)-labelled macrophages, harvested from both apoE<sup>-/-</sup> and apoE/CD36 double knockout (apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup>) mice, were used as tracer cells to assess the role of CD36 on mononuclear phagocyte trafficking, while EP 80317 was used as a pharmacological tool

to correlate labelled cell accumulation to lesion areas to the anti-atherosclerotic effect of the drug. In addition, we documented the effect of EP 80317 on the expression of selected inflammatory proteins in whole aortae.

## **2. Methods**

**Detailed materials and methods are provided in Supplementary Data**

### **2.1. Animals**

Experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals, conforming to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (A5213-01). ApoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice and their littermate controls were backcrossed 6 times to C57BL/6 mice. Four weeks old male mice were fed a high fat high cholesterol (HFHC) diet (D12108) and treated daily with EP 80317 (300 µg/kg) or vehicle (0.9% NaCl) s.c. for a period of 6 or 12 weeks prior to sacrifice.

### **2.2. <sup>111</sup>Indium peritoneal macrophage labeling and *i.v.* injection**

Peritoneal cells from unstimulated apoE<sup>-/-</sup> or apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> donor mice were harvested with 0.9% NaCl containing 10 USP units heparin/mL. Total and differential counts were made prior to cell labelling. Cell viability, as assessed by Trypan Blue exclusion, was ≥ 98%. Peritoneal cells (15 x 10<sup>6</sup>/mL) were labelled with 200 µCi <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> chelated with 2-mercaptopyridine N-oxide.<sup>17</sup> Labelled cells (specific activity ~1.5 x 10<sup>6</sup> cpm/10<sup>6</sup>

macrophages) were suspended in murine platelet poor plasma and injected *i.v* ( $7.5 \times 10^6$  cells) into the left subclavian vein of recipient mice, which have been treated with EP 80317 or vehicle for 12 weeks. After 48 h, mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> asphyxia, the aortae perfused with 10 ml of PBS and excised from the aortic root to the iliac arteries. The mean counts per minute (cpm) were determined in blood and aortae after removing the heart and fat tissues to eliminate non specific radioactive signal. The specific activity of labelled cells was used to express the data in term of <sup>111</sup>In-labelled cells per aorta, after correcting for <sup>111</sup>In decay and leakage from cells over time, and normalizing to  $10^3$  circulating labelled cells. The distribution of isotope-labelled cells throughout the aortic tree was visualized by digital autoradiography (Phosphor Imager screen). Lesion areas of each aorta were assessed by digital analysis following oil red-O staining.

### **2.3. Plasma analysis**

Inflammatory biomarkers were assessed using a mouse atherosclerosis antibody array I (RayBiotech Inc, Norcross, GA, USA) and plasma IL-6 levels were determined using a mouse ELISA kit (Quantikine<sup>®</sup>, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to manufacturer's instructions.

### **2.4. Cell culture**

RAW 264.7 murine macrophage-like cells or peritoneal macrophages were cultured in DMEM containing 10% FBS. Cells were starved overnight in the presence or absence of  $10^{-7}$  M EP 80317 or EP 51389, and then incubated with 10 µg/mL POVPC for either 10 (peritoneal macrophages) or 30 min (RAW cells). In some experiments, RAW cells were



pre-incubated for 30 min with an anti-CD36 antibody (10  $\mu\text{g/mL}$ ) against rat 164-182 residues or with an isotype matched IgG prior to POVPC stimulation. Additional experiments were performed to assess the effect of 4  $\mu\text{M}$  PP2, a non selective Src kinase inhibitor or its inactive analogue, PP3.

## **2.5. RT-PCR**

Total RNA was extracted from entire aortae with Trizol, then reversed transcribed with random primers. Products were amplified by PCR, separated by agarose gel electrophoresis and visualized as detailed in supplementary data.

## **2.6. Western Blot**

Aortic or cellular proteins were separated on SDS-PAGE gel, transferred to nitrocellulose membranes and incubated overnight with antibodies against inducible nitric oxide synthase (iNOS), gp91<sup>phox</sup>, phospho-Pyk2 (P-Pyk2), Pyk2 or  $\beta$ -actin. The membranes were washed, incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and visualized by chemiluminescence (detailed in supplementary data).

## **2.7. Immunostaining**

Deparaffinized sections of the aortic arch were incubated overnight with primary antibodies against vascular endothelial cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) or CCL2 chemokine. Purified rabbit and goat IgG were used as primary negative control antibodies. Sections were incubated with biotinylated secondary antibodies and staining was revealed as detailed in supplementary data. Positively stained areas for VCAM-1

were quantified and expressed as the percentage of the total perimeter of the endothelial lining of the vessel.

## **2.8. Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were performed using a one-way analysis of variance followed by pair-wise multiple comparisons using the Student-Newman-Keuls test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## **3. Results**

### **3.1. EP 80317 reduced $^{111}\text{In}$ -labelled-macrophage recruitment to atherosclerotic lesions**

A prolonged (12 weeks) treatment of HFHC-fed apoE<sup>-/-</sup> mice with EP 80317 reduced  $^{111}\text{In}$ -labelled macrophage accumulation to lesion-prone sites by 65% ( $P < 0.001$ ), from  $16.4 \pm 2.3$  to  $5.8 \pm 2.4 \times 10^3$   $^{111}\text{In}$ -macrophages/aorta (*Figure 1A and B*). This was paralleled by a 43% ( $P < 0.001$ ) reduction in oil red O staining of neutral lipids in lesion areas (*Figure 1C and D*). In addition, EP 80317 reduced by 27% total plasma cholesterol levels ( $P < 0.05$ ) (data not shown), in agreement with our previous studies.<sup>15</sup>

### **3.2. EP 80317 reduced POVPC-induced Pyk2 phosphorylation in macrophages**

RAW cells expressed CD36 on plasma membrane as detected by FACS analysis (data not shown). POVPC (10  $\mu\text{g/mL}$ ) induced maximal phosphorylation of the protein tyrosine kinase Pyk2 in RAW cells after 30 min incubation, as shown by a 2.3-fold increase in the mean P-Pyk2/Pyk2 ratio ( $P < 0.01$ ) (*Figure 2A*). In a similar manner, a

2.4-fold increase in the mean P-Pyk2/Pyk2 ratio ( $P < 0.01$ ) was observed after 10 min incubation in peritoneal macrophages (data not shown). Overnight pre-incubation with  $10^{-7}$  M EP 80317 reduced POVPC-elicited Pyk2 phosphorylation, by  $40 \pm 3.5\%$  and  $25 \pm 1.9\%$  ( $P < 0.01$ ) in RAW cells (*Figure 2B*) and apoE<sup>-/-</sup> peritoneal macrophages (*Figure 2C*), respectively. EP 80317 exerted similar inhibitory effect on oxLDL (25  $\mu\text{g/mL}$ )-stimulated RAW cells (data not shown). In contrast, pre-incubation of RAW cells with  $10^{-7}$  M EP 51389, a tripeptide GHRP analogue which is devoid of binding affinity to CD36, did not modulate POVPC-induced phosphorylation of Pyk2 in mononuclear cells (*Figure 2B*).

### **3.3. POVPC-induced Pyk2 phosphorylation in macrophages is CD36- and Src-dependent**

To further investigate the role of CD36 in POVPC-induced Pyk2 phosphorylation, RAW cells were incubated with an anti-CD36 antibody (10  $\mu\text{g/mL}$ ) prior to POVPC stimulation. The anti-CD36 antibody inhibited POVPC-induced Pyk2 phosphorylation by 38 % ( $P < 0.01$ ), further supporting that POVPC-elicited Pyk2-activation is CD36-dependent (*Figure 3A*). A role for Src kinases as proximal signalling proteins leading to Pyk2 phosphorylation in response to POVPC was then investigated. Pre-incubating RAW cells with 4  $\mu\text{M}$  PP2, a non selective Src kinase inhibitor, greatly reduced Pyk2 phosphorylation below levels detected in unstimulated cells, suggesting that basal as well as POVPC-induced Pyk2 phosphorylation are regulated by Src kinases. Treatment with the inactive analogue PP3 had no inhibitory effect (*Figure 3B*).

### 3.4. Reduced expression of plasma and vascular inflammatory proteins in EP 80317-treated mice

Aortae from apoE<sup>-/-</sup> mice showed reduced mRNA and protein levels of inflammatory biomarkers, including subunits of the NAD(P)H oxidase, as well as of iNOS, CCL-2 and VCAM-1 (*Figure 4*). Indeed, vascular wall mRNA levels of gp91<sup>phox</sup> and p40<sup>phox</sup> were reduced by 67% ( $P < 0.001$ ) and 61% ( $P < 0.05$ ), respectively, and that of iNOS by 57% ( $P < 0.05$ ), as assessed by RT-PCR analysis (*Figure 4A*). In agreement, protein levels of the catalytic subunit gp91<sup>phox</sup> and iNOS were reduced by 50% and 38%, respectively ( $P < 0.05$ ), as assessed by Western blot analysis (*Figure 4C*). In addition, a chronic treatment with EP 80317 reduced by ~50% the mRNA levels of VCAM-1 and that of the CCL2 chemokine ( $P < 0.05$ ) (*Figure 4A*), as well as endothelial VCAM-1 immunostaining in aortic cross-sections (*Figure 4D*). A similar profile was observed for CCL2 (*Figure 4E*). In contrast, the mRNA levels of anti-oxidant enzymes, including SOD-1, catalase and GPx-1, were not significantly modulated following EP 80317 treatment of apoE<sup>-/-</sup> mice (*Figure 4B*). Furthermore, circulating plasma levels of a number of inflammatory proteins were found lower in EP 80317-treated apoE<sup>-/-</sup> mice than in vehicle-treated mice (*Figure 6A*), as shown by a 40% reduction in IL-6 plasma levels, from 19.1 +/- 1.6 to 11.5 +/- 2.2 pg/ml ( $P < 0.05$ ) (*Figure 6B*). In addition, TNF $\alpha$ , M-CSF, GM-CSF, MIP-3 $\alpha$ , RANTES, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 and IL-4 plasma levels also appeared to be reduced in EP 80317-treated apoE<sup>-/-</sup> mice, as assessed in a protein array (*Figure 6A*).

### 3.5. The effect of EP 80317 is CD36-dependent

EP 80317 did not attenuate the accumulation of labelled mononuclear cells that were deficient in CD36 (*Figure 5A*), nor Pyk2 phosphorylation in these cells (*Figure 5B*). Furthermore, gp91<sup>phox</sup>, iNOS, VCAM-1 and CCL-2 mRNA levels were not modulated by EP 80317 treatment in aortae of apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice (*Figure 5C*). In addition, plasma levels of inflammatory cytokines, as revealed in a protein array (*Figure 6C*) were not modulated in EP 80317-treated apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice. In agreement, basal IL-6 plasma levels, although lower in apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> (10.4 +/- 2.5 pg/ml) mice than in apoE<sup>-/-</sup> mice, were not further modulated by EP 80317 treatment (8.6 +/- 1.4 pg/ml) (*Figure 6D*).

## 4. Discussion

The principal finding of this study is the demonstration of a role for CD36 in the regulation of mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesion areas, leading to reduced vascular wall inflammation. Furthermore, we have identified this process to be linked to the activation of the focal adhesion kinase Pyk2, in a Src kinase-dependent manner. Monocytes/macrophages play a central role in atherogenesis, and their recruitment to the arterial wall is tightly regulated by inflammatory cytokines, monocyte chemoattractants, cell adhesion molecules,<sup>18-21</sup> oxLDL and phospholipids,<sup>19,21-23</sup> which may act in a concurrent or sequential manner to facilitate the different steps (margination, adhesion, diapedesis) leading to phagocyte extravasation and their uptake of oxidised LDL and phospholipids. In the present study, both genetic and pharmacological approaches were used to delineate the role of the receptor scavenger

CD36 in mononuclear phagocyte trafficking and vascular inflammation of the aortic tree, in view of its critical role in the pathogenesis of atherosclerosis.<sup>1,24</sup>

To specifically address the role of CD36 in mononuclear phagocyte recruitment, we injected labelled CD36<sup>+/+</sup> or CD36<sup>-/-</sup> mononuclear phagocytes into apoE-deficient mice recipients which have been treated or not with a selective ligand of CD36, EP 80317, using a drug regimen known to provide potent and prolonged anti-atherosclerotic effect.<sup>15</sup> To this purpose, total peritoneal cells mainly composed of macrophages were collected from unstimulated mice and used without further purification steps to avoid either *in vivo* or *ex vivo* cell activation before labelling.<sup>17,25-27</sup> Labelled peritoneal macrophages injected i.v. in mice were previously shown to migrate successfully to inflammatory sites, despite yielding low number of cells in circulation as a consequence of cell trapping in pulmonary capillaries.<sup>28</sup> Labelled macrophages were proposed to be used as a surrogate for the study of monocyte accumulation to inflammatory foci.<sup>29</sup> In agreement, we found that <sup>111</sup>In-labelled macrophages were recruited to atherosclerotic-prone sites, as shown for labelled monocytes.<sup>5</sup> The distribution of the newly recruited labelled cell in the aortic tree, as detected by autoradiography, coincided with neutral lipid staining areas, with predominant staining at the level of the aortic arch and iliac arteries. In previous studies, CD36 expression was shown to be upregulated during monocyte differentiation to macrophage, and following oxLDL stimulation.<sup>30</sup> Hence, exposure of circulating mononuclear phagocytes to oxLDL and other stimuli during atherosclerosis progression in mice may lead to CD36 upregulation in circulating blood monocytes of atherosclerotic mice. A chronic administration of EP 80317 in atherosclerotic mice, did not, however, modulate CD36 protein expression in

macrophages,<sup>15</sup> and is therefore unlikely to account for reduced mononuclear phagocyte cell trafficking. Overall, taking into account the distribution of labelled cells to atherosclerosis prone areas, and the lack of effect of EP 80317 in modulating CD36-deficient cell recruitment, our results strongly support that the tracer cells behaved as expected for circulating monocytes and that CD36 contribute to the regulation of blood mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions, as shown by a reduction in <sup>111</sup>In-labelled mononuclear phagocyte recruitment to lesion areas in EP-80317-treated mice (*Figure 1B*).

Considering that EP 80317 binding site to CD36 partially overlap that of oxLDL,<sup>14</sup> it may be possible that EP 80317 compete with oxidised lipoproteins<sup>31</sup> and oxidised phospholipids<sup>32</sup> for CD36 binding. However, oxLDL has also been shown to regulate monocyte trafficking indirectly, through upregulating chemokines such as CCL2 within intima and/or endothelial lining.<sup>33-35</sup> Alternatively, a cross-talk between CD36 and 7-transmembrane chemokine receptors and/or cell adhesion molecules may regulate mononuclear phagocyte trafficking, as suggested by the reduced CCL2-stimulated chemotaxis of CD36-deficient macrophages.<sup>4</sup>

Stuart et al. showed that activation of Pyk2 contributed to the remodelling of actin cytoskeleton and microglia migration following stimulation of CD36 by  $\beta$ -amyloid.<sup>3</sup> In agreement, our results show that CD36 signalling elicited by POVPC lead to Pyk2 phosphorylation, the latter being abrogated by a specific anti-CD36 antibody (*Figure 3*). In a similar manner, targeted deletion of CD36 inhibited Pyk2 phosphorylation, as well as tracer cell accumulation to lesions (*Figure 5A and B*), further supporting a role for

CD36 signalling in mononuclear phagocyte trafficking.<sup>36-39</sup> Members of the Src family kinases have previously been shown to initiate signalling downstream of CD36<sup>2,3,40</sup> and their activation was recently found to result in a CD36-dependent phosphorylation of FAK, another member of the focal adhesion kinase family.<sup>41</sup> In agreement, activation of Src kinases downstream of CD36 likely contributed to Pyk2 phosphorylation, as shown by the abrogation of POVPC-induced Pyk2 activation by Src kinase inhibitors. Furthermore, EP 51389, a GHRP analogue devoid of binding affinity to CD36 did not modulate Pyk2 phosphorylation (*Figure 2B*), also in line with a role of CD36 signalling in the regulation of Pyk2 phosphorylation.

Owing to the short intracytoplasmic domains of CD36, it has been proposed that CD36 may signal through its interaction with other transmembrane signalling receptors such as  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrins, SR-A and TLR2.<sup>42-46</sup> Along that line, Bamberger et al. identified a multireceptor complex for  $\beta$ -amyloid stimulation involving CD36,  $\alpha 6 \beta 1$  integrin and the integrin-associated protein CD47, which appears to mediate the adhesion of  $\beta$ -amyloid to microglia and subsequent signalling pathways.<sup>44</sup> In recent studies, oxLDL-elicited CD36 signalling in monocytes was shown to occur independently of TLR2 and SRA, with the short carboxy-terminal intracellular domain of CD36 sufficient for the recruitment of the Src kinase Lyn and MEKK2 activation, although a crosstalk between CD36 and SRA pathways could not be excluded.<sup>2</sup> In platelets, integrin outside-in signalling appeared not to be involved in oxLDL-induced JNK activation downstream of CD36.<sup>40</sup> Yet, a potential crosstalk between CD36 and  $\beta 1$ - or  $\beta 2$ -integrins in regulating monocyte trafficking to aortic lesions might be possible.



We also investigated whether the reduced mononuclear phagocytes trafficking to lesion areas could be correlated with reduced systemic and/or vascular inflammation. Our results show that a chronic treatment with EP 80317 in apoE<sup>-/-</sup> mice attenuated total aortic expression of VCAM-1 and CCL2, as well as that of iNOS and NAP(P)H oxidase, at both the mRNA and protein levels (Figure 4). Reactive oxygen species, whether generated in activated endothelium, macrophages, or vascular smooth muscle cells, as well as iNOS-derived nitric oxide (NO), are key players in atherosclerosis plaque progression.<sup>47,48</sup> However, the role of NAD(P)H oxidase in atherosclerotic plaque development has been questioned inasmuch as knocking out the catalytic gp91<sup>phox</sup> subunit in apoE-deficient mice did not prevent atherosclerosis progression.<sup>49</sup> In contrast, a correlation between gp91<sup>phox</sup> mRNA levels and the severity of atherosclerosis has been reported previously.<sup>50</sup> In agreement with the latter, a role for NAD(P)H oxidase in atherosclerosis following the disruption of p47<sup>phox</sup> was shown by reducing lesion areas in descending aortae of apoE<sup>-/-</sup> mice.<sup>51,52</sup> In agreement, our results show that a chronic treatment with EP 80317, as a selective CD36 ligand, reduced both gp91<sup>phox</sup> and iNOS mRNA and protein levels in aortae. In the context of atherosclerosis, both monocytes/macrophages and vascular smooth muscle cells (which also express CD36 in contrast to aortic endothelial cells) may be targets of the peptide. Reduced gp91<sup>phox</sup> and iNOS may contribute to reduce vascular wall oxidative stress and thereby LDL oxidation, thus breaking the vicious circle of events leading to vascular wall inflammation and monocytes/macrophages accumulation in intima. A link between CD36 and ROS formation has already been proposed in the context of cerebral ischemia and reperfusion, where the levels of ROS are markedly reduced in CD36-deficient mice

following reperfusion.<sup>53</sup> A possible mechanism whereby EP 80317 may exert its anti-atherosclerotic effect may be through the activation of the PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABC transporter pathway in macrophages,<sup>15</sup> which in addition to regulating cholesterol efflux, negatively regulates iNOS expression<sup>54</sup> and proinflammatory cytokines including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in human monocytes.<sup>55</sup> Hence, the latter may also account for the anti-inflammatory activity of the peptide at the vascular level, as well as for reduced IL-6 plasma concentrations (*Figure 6*). Further studies will be necessary to understand the molecular mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of the peptide, as well as the potential crosstalk between CD36, integrins and chemoattractant receptor signalling in regulating monocyte trafficking and vascular wall inflammation.

In conclusion, our data show that a systemic treatment with EP 80317 reduces mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesion areas in a CD36- and Src kinase-dependent manner, in association with reduced vascular wall inflammation. Targeting CD36 may represent a novel anti-atherosclerotic strategy.

## **Funding**

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) [MOP-62837 to H.O. and S.M.]; Ardana Bioscience, Edinburgh, UK [to H.O. and S.M.]; and by scholarships from the CIHR/Rx&D and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec [to D.H.].

**Acknowledgments**

The authors are grateful to Eve-Marie Charbonneau, Roxane Grégoire-Taillefer and Dominique Lauzier for technical assistance.

**Conflict of interest**

None declared.

## References

1. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF *et al.* Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000;105:1049-1056.
2. Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 2006;4:211-221.
3. Stuart LM, Bell SA, Stewart CR, Silver JM, Richard J, Goss JL *et al.* CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex. *J Biol Chem* 2007;282:27392-27401.
4. Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE *et al.* Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res* 2008;78:185-196.
5. Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF, Aikawa E, Jaffer FA, Libby P *et al.* Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10340-10345.
6. Braunersreuther V, Mach F. Leukocyte recruitment in atherosclerosis: Potential targets for therapeutic approaches? *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2079-2088.
7. Mine S, Tabata T, Wada Y, Fujisaki T, Iida T, Noguchi N *et al.* Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway. *Atherosclerosis* 2002;160:281-288.

- 8.Hashimoto K, Kataoka N, Nakamura E, Tsujioka K, Kajiya F. Oxidized LDL specifically promotes the initiation of monocyte invasion during transendothelial migration with upregulated PECAM-1 and downregulated VE-cadherin on endothelial junctions. *Atherosclerosis* 2007;194:e9-e17.
- 9.Leitinger N, Tyner TR, Oslund L, Rizza C, Subbanagounder G, Lee H *et al.* Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12010-12015.
- 10.Subbanagounder G, Deng YJ, Borromeo C, Dooley AN, Beliner JA, Salomon RG. Hydroxy alkenal phospholipids regulate inflammatory functions of endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 2002;38:201-209.
- 11.Kadl A, Huber J, Gruber F, Bochkov VN, Binder BR, Leitinger N. Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids in vivo by quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS. *Vascul Pharmacol* 2002;38:219-227.
- 12.Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP *et al.* Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 2000;105:1095-1108.
- 13.Podrez EA, Poliakov E, Shen ZZ, Zhang RL, Deng YJ, Sun MJ *et al.* Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 2002;277:38503-38516.
- 14.Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R *et al.* Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J* 2004;382:417-424.

- 15.Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, Wang YF *et al.* EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J* 2005;19:1869-1871.
- 16.Avallone R, Demers A, Rodrigue-Way A, Bujold K, Harb D, Anghel S *et al.* A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma- dependent pathway. *Mol Endocrinol* 2006;20:3165-3178.
- 17.Faccioli LH, Nourshargh S, Moqbel R, Williams FM, Sehmi R, Kay AB *et al.* The accumulation of In-111 eosinophils induced by inflammatory mediators, invivo. *Immunology* 1991;73:222-227.
- 18.Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* 2006;37:208-222.
- 19.Zernecke A, Weber C. Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Res Cardiol* 2005;100:93-101.
- 20.Steffens S, Mach F. Inflammation and atherosclerosis. *Herz* 2004;29:741-748.
- 21.Sheikine Y, Hansson GK. Chemokines and atherosclerosis. *Ann Med* 2004;36:98-118.
- 22.Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc* 2002;35:179-203.
- 23.Daugherty A, Webb NR, Rateri DL, King VL. Cytokine regulation of macrophage functions in atherogenesis. *J Lipid Res* 2005;46:1812-1822.

24. Febbraio M, Guy E, Silverstein RL. Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2333-2338.
25. Teixeira MM, Reynia S, Robinson M, Shock A, Williams TJ, Williams FM *et al.* Role of CD18 in the accumulation of eosinophils and neutrophils and local oedema formation in inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br J Pharmacol* 1994;111:811-818.
26. Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 1995;182:1169-1174.
27. Marleau S, Fruteau de Lacos B, Sanchez AB, Poubelle PE, Borgeat P. Role of 5-lipoxygenase products in the local accumulation of neutrophils in dermal inflammation in the rabbit. *J Immunol* 1999;163:3349-3458.
28. Audran R, Collet B, Moisan A, Toujas L. Fate of mouse macrophages radiolabelled with PKH-95 and injected intravenously. *Nucl Med Biol* 1995;22:817-821.
29. Rosen H, Gordon S. Adoptive transfer of fluorescence-labeled cells shows that resident peritoneal macrophages are able to migrate into specialized lymphoid organs and inflammatory sites in the mouse. *Eur J Immunol* 1990;20:1251-1258.
30. Tuomisto TT, Riekkinen MS, Viita H, Levonen AL, Yla-Herttuala S. Analysis of gene and protein expression during monocyte-macrophage differentiation and cholesterol loading--cDNA and protein array study. *Atherosclerosis* 2005;180:283-291.
31. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of

- monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2995-2998.
- 32.Berliner JA. A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis. *N Engl J Med* 2005;353:9-11.
- 33.Cybulsky MI, Iiyama K, Li HM, Zhu SN, Chen M, Iiyama M *et al.* A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107:1255-1262.
- 34.Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2(-/-) mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-897.
- 35.Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999;143:205-211.
- 36.Watson JM, Harding TW, Golubovskaya V, Morris JS, Hunter D, Li X *et al.* Inhibition of the calcium-dependent tyrosine kinase (CADTK) blocks monocyte spreading and motility. *J Biol Chem* 2001;276:3536-3542.
- 37.Okigaki M, Davis C, Falasca I, Harroch S, Felsenfeld DP, Sheetz MP *et al.* Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10740-10745.
- 38.Owen KA, Pixley FJ, Thomas KS, Vicente-Manzanares M, Ray BJ, Horwitz AF *et al.* Regulation of lamellipodial persistence, adhesion turnover, and motility in macrophages by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 2007;179:1275-1287.
- 39.Baruzzi A, Cavegion E, Berton G. Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2175-2190.



- 40.Chen K, Febbraio M, Li W, Silverstein RL. A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res* 2008;102:1512-1519.
- 41.Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* 2009;119:136-145.
- 42.Stern M, Savill J, Haslett C. Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis - Mediation by alpha(v)beta(3)/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am J Pathol* 1996;149:911-921.
- 43.Thorne RF, Marshall JF, Shafren DR, Gibson PG, Hart IR, Burns GF. The integrins alpha(3)beta(1) and alpha(6)beta(1) physically and functionally associate with CD36 in human melanoma cells - Requirement for the extracellular domain of CD36. *J Biol Chem* 2000;275:35264-35275.
- 44.Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci* 2003;23:2665-2674.
- 45.Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K *et al.* CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005;433:523-527.
- 46.Stuart LM, Deng JS, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ *et al.* Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 2005;170:477-485.

47. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG *et al.* Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2479-2488.
48. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:471-478.
49. Kirk EA, Dinauer MC, Rosen H, Chait A, Heinecke JW, LeBoeuf RC. Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1529-1535.
50. Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP *et al.* Superoxide production and expression of Nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1429-1435.
51. Hsich E, Segal BH, Pagano PJ, Rey FE, Paigen B, Deleonardis J *et al.* Vascular effects following homozygous disruption of p47(phox) - An essential component of NADPH oxidase. *Circulation* 2000;101:1234-1236.
52. Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu ZY, Holland SM, Yeh ETH *et al.* p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest* 2001;108:1513-1522.
53. Cho S, Park EM, Febbraio M, Anrather J, Park L, Racchumi G *et al.* The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. *J Neurosci* 2005;25:2504-2512.
54. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79-82.

55. Jiang CY, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82-86.

## Figure legends

**Figure 1 Effect of chronic administration of EP 80317 on  $^{111}\text{In}$ -labelled macrophage accumulation to atherosclerotic lesions.** (A) Autoradiography of aortae from apoE<sup>-/-</sup> mice pretreated with 0.9% NaCl (upper panel) or EP 80317 (300 µg/kg/d) for 12 weeks (lower panel). (B) Number of  $^{111}\text{In}$ -labelled cells per aorta in mice treated with 0.9% NaCl or EP 80317. (C) Representative aortae from apoE<sup>-/-</sup> mice pretreated with vehicle (upper panel) or EP 80317 (lower panel) stained with oil Red O. (D) Morphometric analysis of aortic lesions, expressed as percentage of lesion areas of total aorta. Results are the mean of 3 separate experiments with 4-10 mice per treatment in each experiment. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with vehicle.

**Figure 2 Effect of EP 80317 or EP 51389 on POVPC-elicited Pyk2 phosphorylation.** (A) RAW 264.7 cells were incubated with POVPC (10 µg/mL) for 0-60 min. (B) RAW 264.7 cells were incubated overnight in the presence of  $10^{-7}\text{M}$  EP 80317 or EP 51389 prior to incubation with POVPC (10 µg/mL) for 30 min. (C) Peritoneal macrophages harvested from apoE<sup>-/-</sup> mice and incubated with  $10^{-7}\text{M}$  EP 80317 overnight prior to incubation with POVPC (10 µg/mL) for 10 min. Western blot analysis of phosphorylated (P-Pyk2) and total Pyk2. Data are the mean  $\pm$  SEM of 4 (RAW cells, duplicate) or 5 separate experiments (peritoneal macrophages pooled from 4-5 mice in each experiment). \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$  versus PBS; ##,  $P < 0.01$  versus POVPC.

**Figure 3 POVPC-induced Pyk2 phosphorylation is CD36- and Src-dependent.**

RAW 264.7 cells stimulated with POVPC (10 µg/mL, 30 min) following (A) pre-incubation with an anti-CD36 antibody (10 µg/mL) or a control isotype matched IgG (10 µg/mL) for 30 min, (B) pre-incubation with 0.04% DMSO (vehicle), PP2 (4 µM) or PP3 (4 µM) for 30 min. Protein lysates were analysed by Western blotting for P-Pyk2 and total Pyk2. Data are the mean ± SEM of 3 separate experiments performed in 2-5 replicates. \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with PBS; ###,  $P < 0.001$  compared with POVPC.

**Figure 4 Effect of EP 80317 on inflammatory biomarker expression in the vascular wall. Aortae were extracted from apoE<sup>-/-</sup> mice treated with EP 80317 or vehicle and RNA and protein were isolated for expression studies.** RT-PCR analysis (A) of the NADPH subunits, gp91<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, iNOS, VCAM-1 and CCL2, and (B) of SOD-1, catalase and GPx-1 in aortic extracts. (C) Western blots of iNOS and gp91<sup>phox</sup> in cytosolic and membrane fractions, respectively. Results are expressed as the mean percent (± SEM) of vehicle-treated mice, set to 100%. (D) VCAM-1 immunostaining in cross-sections from the aortic arch in vehicle (0.9% NaCl) (a) and EP 80317-treated mice (b). Corresponding non specific IgG staining is presented in vehicle- (c) and EP 80317- (d) treated mice. (E) CCL2 immunostaining in cross-sections from the aortic arch in vehicle (e and g) and EP 80317-treated mice (f and h). Corresponding non specific IgG staining is presented in (i) and (j). Original magnification x 40 (except e and f, x 10). N = 3-5 mice per group. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with vehicle.

**Figure 5 Accumulation of labelled-macrophages into aortae is CD36 dependent.** (A)

Autoradiography of labeled CD36-deficient cells in aortae from apoE<sup>-/-</sup> mice pretreated with vehicle (upper panel) or EP 80317 (lower panel). <sup>111</sup>In-labelled cells per aorta are expressed as the mean percent ( $\pm$  SEM) of vehicle-treated mice, set at 100%. Results are the mean of 3 separate experiments with 3-4 mice per treatment in each experiment. (B) Western blot analysis of Pyk2 phosphorylation in mouse peritoneal macrophages isolated from apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice (n=5 separate experiments, cells pooled from 4-5 mice in each experiment). (C) RT-PCR analysis of inflammatory biomarkers from apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> aortic extracts from three to four mice per group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

**Figure 6 Effect of EP 80317 on plasma inflammatory cytokines.** Cytokine array of plasma pooled from: (A) 10 apoE<sup>-/-</sup>, (C) 10 apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> mice per group, pretreated or not for 12 weeks with EP 80317 (300  $\mu$ g/kg/day) (detailed design of the protein array is presented in supplementary data). Plasma IL-6 levels, as assessed by high sensitivity ELISA in: (B) apoE<sup>-/-</sup> mice, (D) apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> mice. Results are the mean  $\pm$  SEM, n  $\geq$  4 mice per group; \*  $P < 0.05$ .

## Supplementary Data

### Materials

All solutions for s.c injections were made from pyrogen-free, sterile 0.9% NaCl (Baxter Corporation, Toronto, Ontario, Canada). The mouse diet D12108 (Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) is a cholate-free AIN-76A semi-purified diet, containing 1.25% wt/wt cholesterol and 40% wt/wt fat. EP 80317 and EP 51389 were provided by Europeptides (Argenteuil, France). The murine cell line RAW 264.7 was obtained from ATCC (Rockville, MD, USA). Human low density lipoproteins (LDL) were purchased from Biomedical Technologies (Stoughton, MA, USA) and POVPC was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) or Avanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL, USA). Indium-111 ( $^{111}\text{InCl}_3$ ) (600–1000 mCi/mL) was obtained from Perkin Elmer (Boston, MA, USA). Heparin was from Organon (Toronto, Ontario, Canada). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 4.5 g/L glucose, L-glutamine and sodium pyruvate was purchased from Wisent Bioproducts (St-Bruno, Quebec, Canada). Fetal bovine serum (FBS) was from Hyclone (Logan, UT, USA). PP2 (# 529573) and PP3 (# 529574) were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Antibodies to iNOS (# 610328) and gp91<sup>phox</sup> (# 611414) were from BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada), antibody to  $\beta$ -actin (# A5316) was from Sigma (St Louis, MO, USA) and goat anti-mouse peroxidase-labelled antibody (# 074-1806) was from KPL (Gaithersburg, MD, USA). Antibody to phospho-Pyk2 Tyr-579/580 (# 44-636G) was from Biosource (Camarillo, CA, USA), that to unphosphorylated Pyk2 (# 06-559) was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) and goat anti-rabbit peroxidase-labelled antibody (# 111-035-008) was from Jackson ImmunoResearch (Westergrove, PA, USA).

Antibodies to VCAM-1 (sc-8304), to CCL-2 (sc-1784), purified rabbit (sc-2027) and goat IgG (sc-2028) were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). The biotinylated goat anti-rabbit IgG (BA-1000) and horse anti-goat (BA-9500) were purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA). The phycoerythrin-conjugated anti-mouse CD36 monoclonal antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (sc-13572 PE). The rabbit polyclonal anti-CD36 antibody (A371) was produced in house and the isotype-matched IgG (# 011-000-003) was purchased from Jackson ImmunoResearch.

### **Radioactivity measurement**

<sup>111</sup>Indium counts were determined using a Cobra II gamma counter (PerkinElmer, Woodbridge, Ontario, Canada), equipped with a 3-inch thallium-activated sodium iodide detector, and set within the 135 - 300 keV energy range.

### **RT-PCR**

Entire aortae were isolated from mice treated for 6 weeks. Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and treated with DNase I, Amplification Grade (Sigma, St Louis, MO, USA). RNA was reversed transcribed with random primers using M-MLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen). Reverse transcription products were amplified by PCR with specific primers using Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Detailed information regarding primers is available in the table below. Equal amounts of RT-PCR products were loaded on 1.5% or 2.5% agarose gels and absorbance of ethidium bromide-stained cDNA bands was quantified using the Typhoon



9410 Scanner (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Quebec, Canada). Gene expression was normalized to the respective internal standard gene 18S.

Gene	Forward primer	Reverse primer	Amplicon
gp91 <sup>phox</sup>	TTGGGTCAGCACTGGCTCTG	TGGCGGTGTGCAGTGCTATC	204 pb
p22 <sup>phox</sup>	GTCCACCATGGAGCGATGTG	CAATGGCCAAGCAGACGGTC	164 pb
p67 <sup>phox</sup>	CTGGCTGAGGCCATCAGACT	AGGCCACTGCAGAGTGCTTG	214 pb
p47 <sup>phox</sup>	GATGTTCCCCATTGAGGCCG	GTTTCAGGTCATCAGGCCGC	212 pb
p40 <sup>phox</sup>	GCCGCTATCGCCAGTTCTAC	GCAGGCTCAGGAGGTTCTTC	189 pb
iNOS	TGGCCACCTTGTTTCAGCTACG	GCCAAGGCCAAACACAGCATAAC	212 pb
SOD-1	CAGCATGGGTTCACGTCCA	CACATTGGCCACACCGTCCT	168 pb
GPx-1	GGGCAAGGTGCTGCTCATTG	AGAGCGGGTGAGCCTTCTCA	269 pb
Catalase	CCAGCGACCAGATGAAGCAG	CCACTCTCTCAGGAATCCGC	198 pb
VCAM-1	ACAAAACGATCGCTCAAATCG	CGCGTTTAGTGGGCTGTCTATC	110 pb
CCL2	GCCAATCTCACTGAAGCC	GCTGGTGAATGAGTAGCAGC	161 pb
18S	GGACCAGAGCGAAAGCATTTGCC	TCAATCTCGGGTGGCTGAACGC	496 pb

### Western Blot

Aortae isolated from mice treated for 6 weeks were homogenized in ice-cold lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada)]. The lysates were fractionated into cytosol (for iNOS expression) and membrane (for gp91<sup>phox</sup> expression) fractions by ultracentrifugation (100,000 g, 1 h, 4°C). Cells were incubated for 10 min (peritoneal macrophages) or 30 min (RAW 264.7)

with POVPC (10 µg/mL), than washed with ice-cold PBS and lysed in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche Diagnostics and Sigma). Forty to eighty µg of protein were separated on a 7.5% or 10% SDS-PAGE gel and then transferred to nitrocellulose membranes and incubated overnight with antibodies against iNOS (1/1000), gp91<sup>phox</sup> (1/1000), phospho-Pyk2 Tyr-579/580 (P-Pyk2) (1/1000) or β-actin (internal loading control, 1/5000). The membranes were washed with Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 (TBS-T) and incubated with horseradish peroxidase-conjugated second antibody (1/10000) for 1 h. The reaction was visualized by chemiluminescence (ECL plus, Amersham Biosciences) and signals were analysed with ImageQuant 5.2 software (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). For Pyk2 analysis, membranes were stripped, reprobed for total Pyk2 (1/1000) and analyzed as described above.

### **Immunostaining**

Aortae isolated from 12 week-treated mice were cut into 3 equal segments and fixed in 10% formalin PBS-buffered solution, processed for standard histological procedures and embedded in paraffin. Five sections of 6 µm each were obtained by microtome along the length of each specimen. Sections were deparaffinized in xylene and ethanol baths, and endogenous peroxidase activity quenched in a solution of methanol and hydrogen peroxide. The primary antibodies used, a rabbit polyclonal anti-VCAM-1 IgG (1/100) immunoreactive with mouse VCAM-1, and a goat polyclonal anti-mouse-CCL2 (1/250), were applied at 4°C overnight. Purified rabbit and goat IgG were used as negative control antibodies at the same concentration than the specific primary antibody. After

washing with PBS, the slides were incubated for 60 min with a biotinylated goat anti-rabbit IgG and horse anti-goat (1/400) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Peroxidase labelling was achieved by incubation with an avidin/peroxidase complex (ABC kit; Vector Laboratories Inc.), visualized after 2 min exposure to 3,3'-diaminobenzidine solution (DAB kit; Vector Labs Inc.). Sections were counterstained by rapid immersion in Mayer's hematoxylin solution, rinsed in tap water, dehydrated and mounted with Permount solution. Images were captured using an optical microscope (Axio Imager.A1, Carl Zeiss, Toronto, Ontario, Canada) equipped with a video camera.

### **Flow cytometry analysis**

Flow cytometry analysis were performed on RAW 264.7 murine cell line by using  $1 \times 10^6$  cells that were incubated with phycoerythrin-conjugated anti-mouse CD36 antibody (2  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) for 30 min at 4°C. After three washes with ice-cold PBS, CD36 surface protein expression was measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis using a FACSCalibur system (BD Biosciences).

### **LDL oxidation**

LDL (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was oxidized using 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  in PBS at 37°C for 24 hours. Oxidation was terminated by the addition of 40  $\mu\text{M}$  butylated hydroxytoluene and 100  $\mu\text{M}$  EDTA and kept for a maximum of 3 weeks at 4°C.

**Table I. RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array Design.**

POS	POS	POS	POS	Blank	bFGF	CD40	Eotaxin
NEG	NEG	NEG	NEG	Blank	bFGF	CD40	Eotaxin
GCSF	GM-CFS	IFN $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-3	IL-4
GCSF	GM-CFS	IFN $\gamma$	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-3	IL-4
IL-5	IL-6	IL-13	L-Selectin	MCP-1	M-CSF	MIP-3 $\alpha$	P-Selectin
IL-5	IL-6	IL-13	L-Selectin	MCP-1	M-CSF	MIP-3 $\alpha$	P-Selectin
RANTES	TNF $\alpha$	VEGF	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
RANTES	TNF $\alpha$	VEGF	Blank	Blank	Blank	POS	POS

Figures

Figure 1

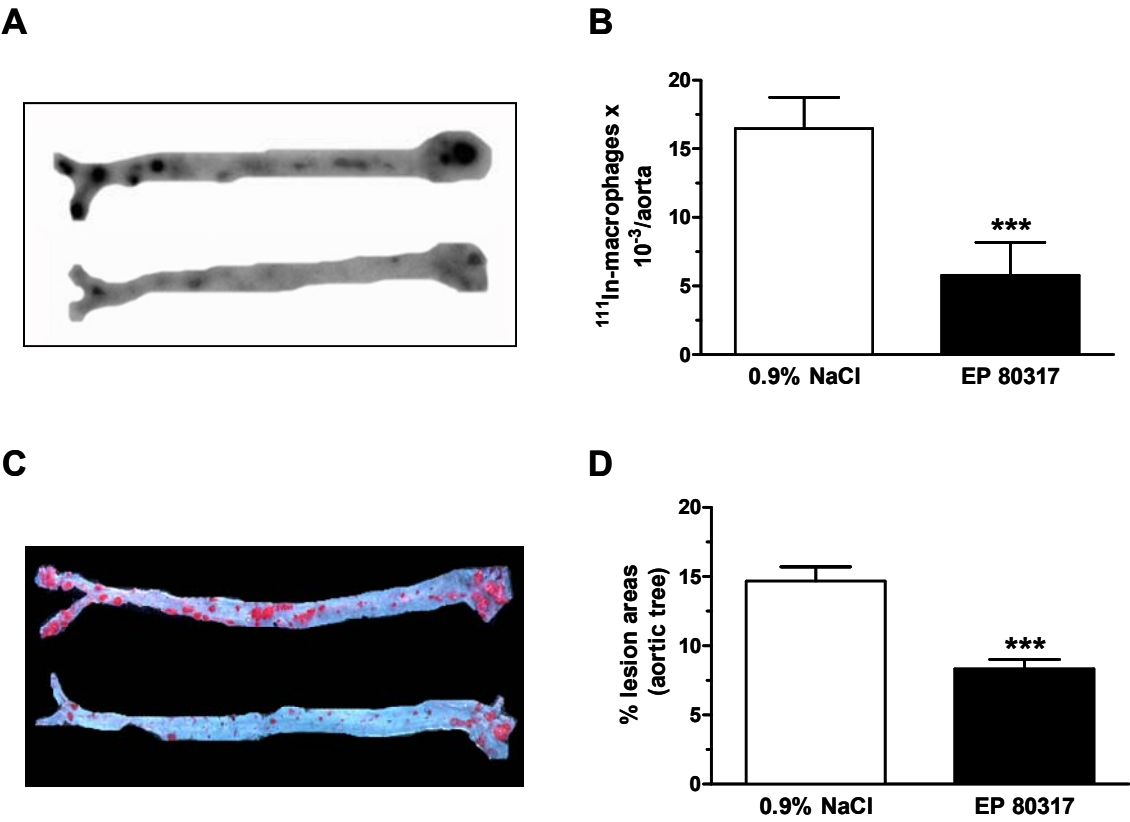


Figure 2

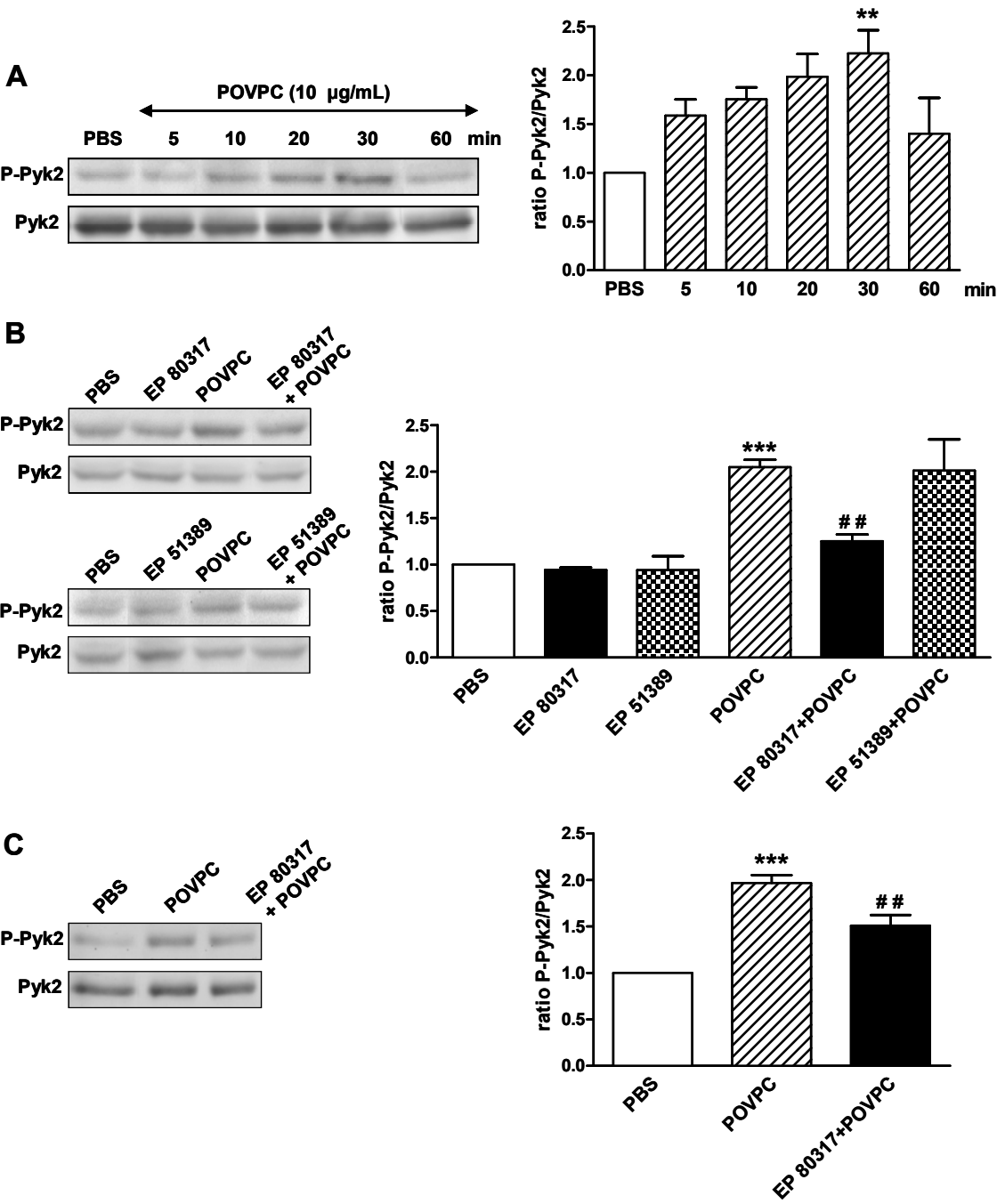


Figure 3

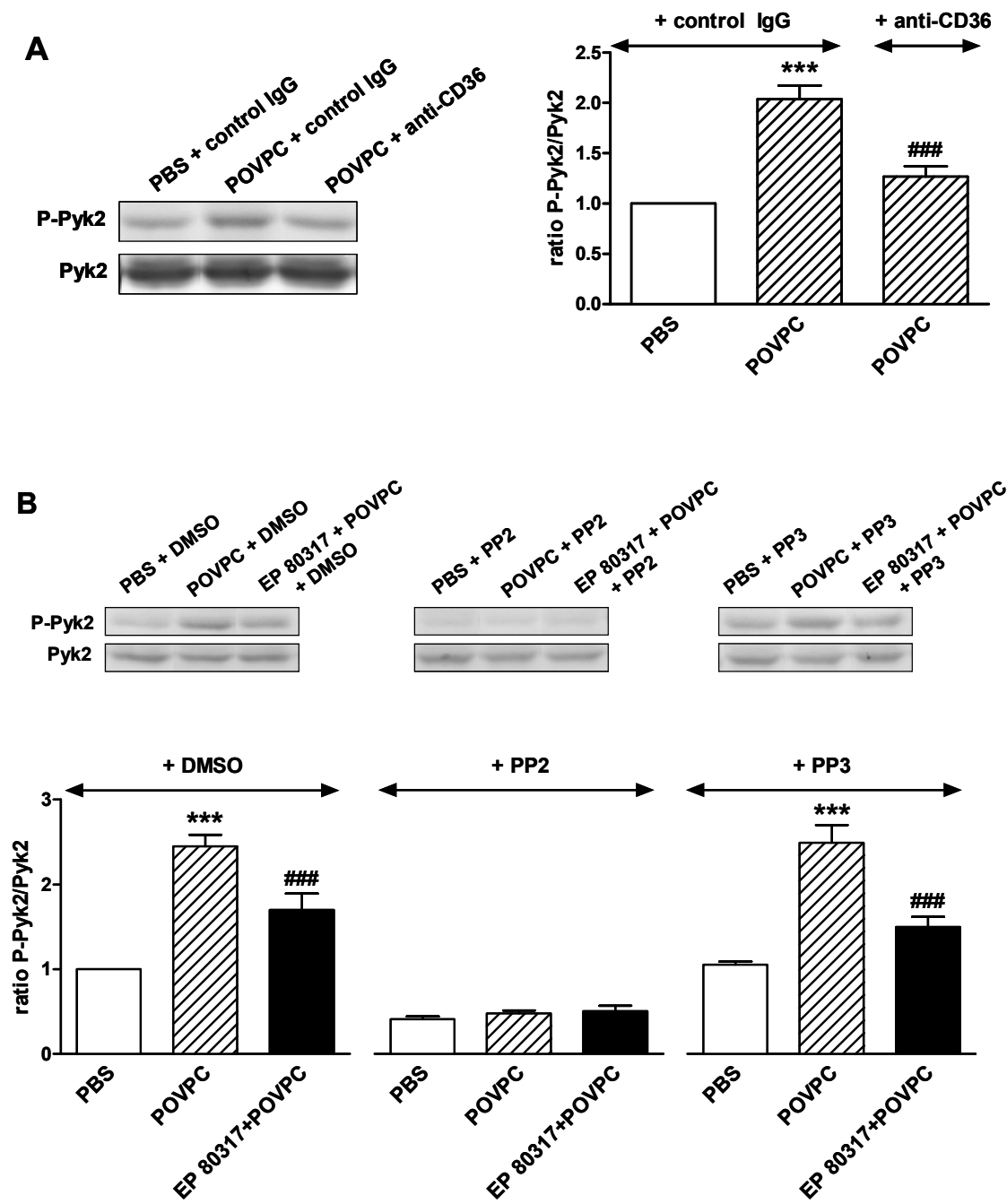


Figure 4

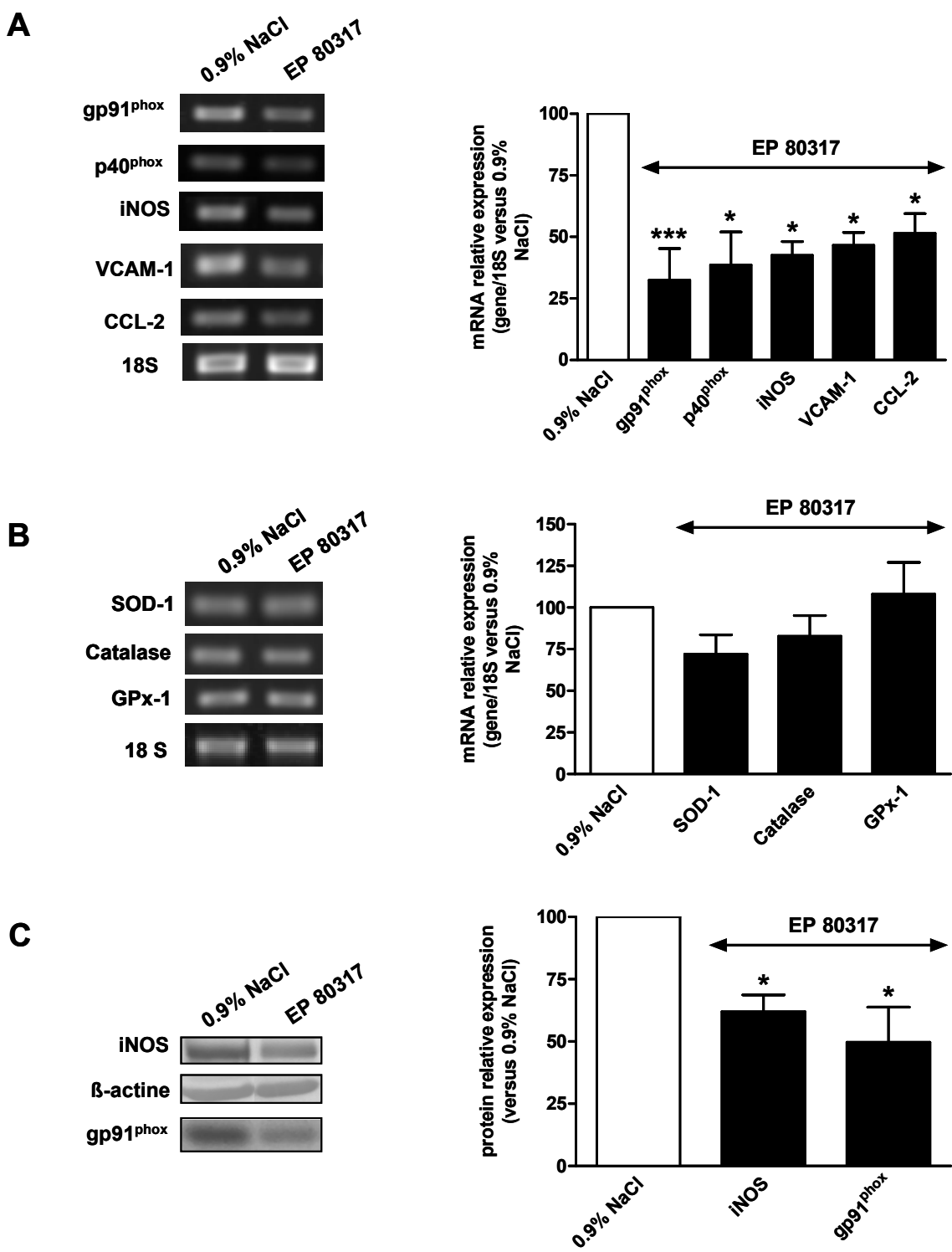




Figure 4 Followed

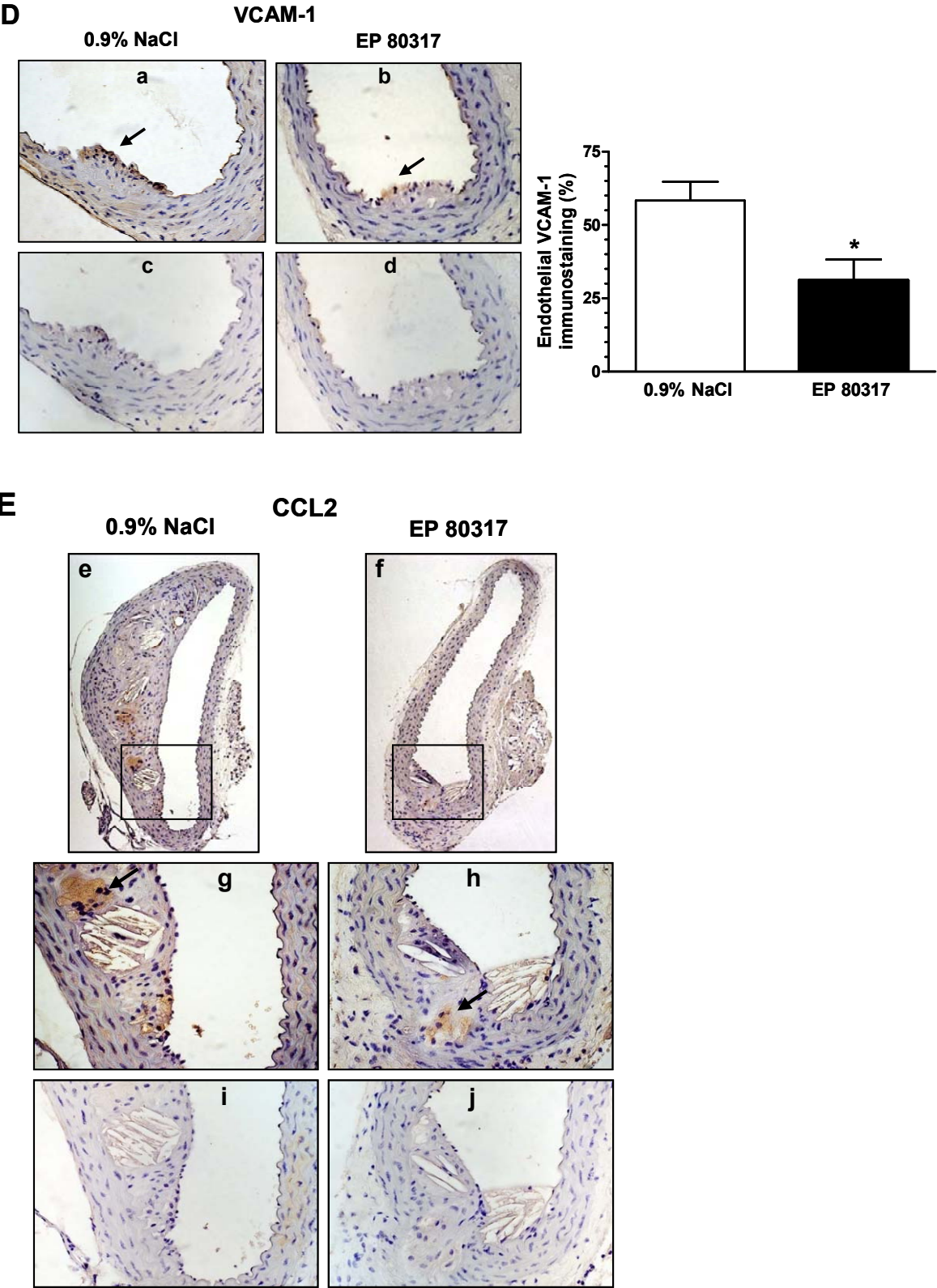


Figure 5

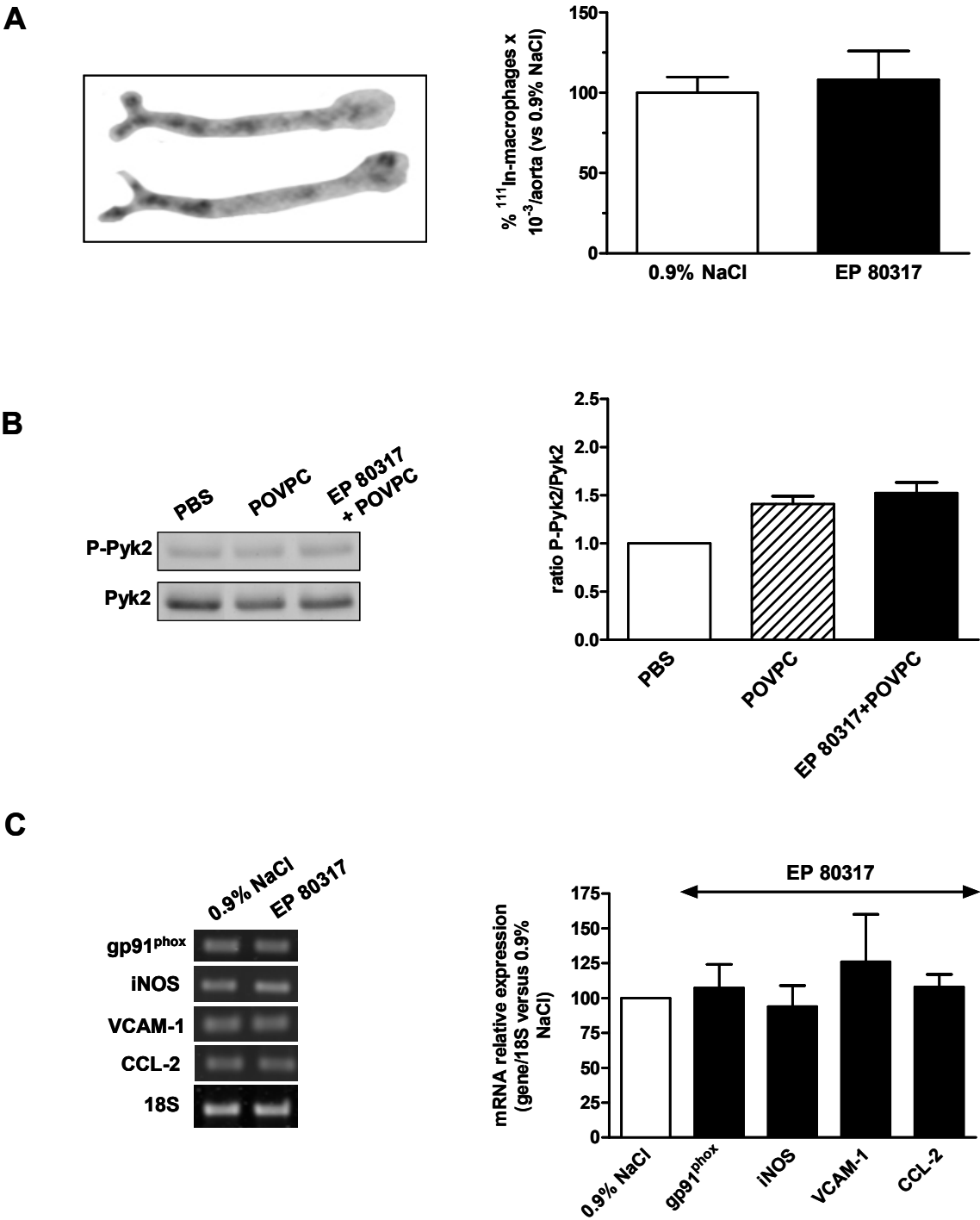
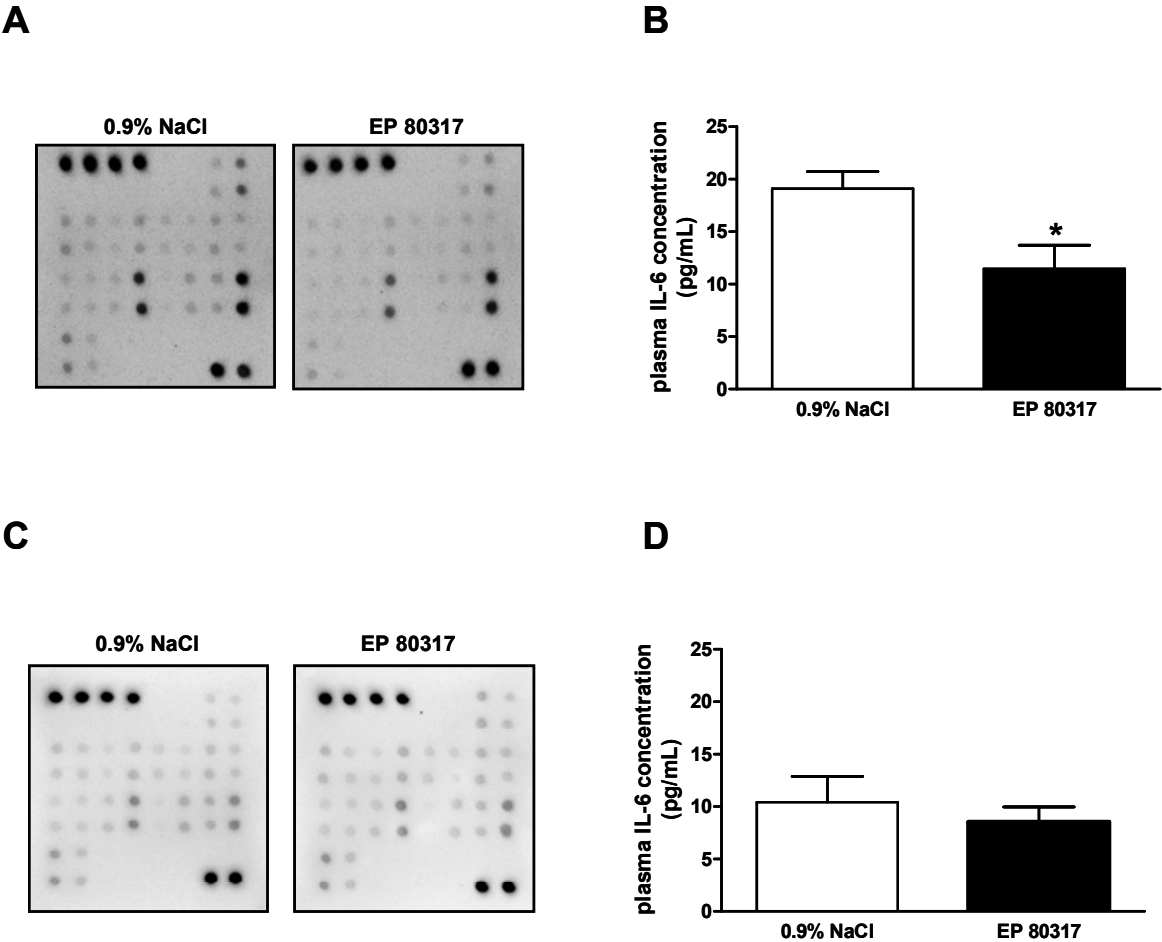
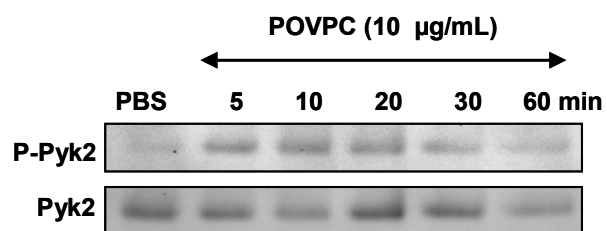


Figure 6



### Résultats supplémentaires

**Figure S1. Activation de Pyk2 induite par les phospholipides oxydés (PCox<sub>CD36</sub>) au niveau des macrophages péritonéaux résidents de souris.** Le POVPC induit une phosphorylation rapide de Pyk2 au niveau des macrophages péritonéaux résidents (Harb et al., données non publiées).



## **Chapitre 7**

**Le rôle du récepteur CD36 de la microvasculature endothéliale dans la  
régulation du recrutement des leucocytes polymorphonucléaires au  
niveau des sites inflammatoires aigus murins**

### 7.1. Avant-propos

Les données récentes de la littérature appuient un rôle important du récepteur CD36 dans l'inflammation. Nos propres travaux ont montré que le récepteur CD36 exprimé par les phagocytes mononucléés régule la migration de ces cellules au niveau des plaques athérosclérotiques (Harb et al., 2009, article II). De plus, l'effet anti-athérosclérotique des analogues des GHRPs, qui interfèrent avec la fonction éboueur du CD36 (Marleau et al., 2005; article I), est associé à une atténuation de la réponse inflammatoire vasculaire et systémique (Harb et al., 2009, article II). Cependant, la majorité des études ont été consacrées à l'étude du rôle pro-inflammatoire du CD36 au niveau des monocytes/macrophages (Stewart et al, 2010; Park et al, 2009; Kuchibhotla et al, 2008; Rahaman et al, 2006; Medeiros et al, 2004) ou des microglies (Stuart et al., 2007; El Khoury et al., 2003; Bamberger et al., 2003; Moore et al., 2002; Coraci et al., 2002) et très peu d'études ont documenté le rôle potentiellement inflammatoire du CD36 exprimé par les cellules endothéliales de la microvasculature. Étant donné l'importance de l'endothélium microvasculaire dans la régulation de la transmigration des leucocytes au niveau des sites inflammatoires (Pober et al., 1990; Granger et al., 1994; Cooper et al., 2002), nous avons étudié le rôle des récepteurs CD36 endothéliaux dans un contexte d'inflammation aiguë.

Bien que les PMN n'expriment pas le CD36, ils sécrètent en concentration élevée un ligand endogène du CD36, l'hétérodimère S100A8/A9 (Kerkhoff et al., 2001). Cet hétérodimère est une protéine de liaison endogène pour l'acide arachidonique (AA) (Kerkhoff et al., 1999) et pour le leucotriène A4 (LTA4) (Rector et al., 2009) qui sont tous les deux des précurseurs de puissants médiateurs lipidiques pro-inflammatoires

(Harizi et al., 2008; Gerritsen et al., 1996). Le complexe S100A8/A9 peut être sécrété à partir des PMN stimulés après contact avec l'endothélium activé (Frosch et al., 2000) ou en présence des facteurs chimiotactiques (Hetland et al., 1998) et est retrouvé *in vivo* au niveau de l'endothélium inflammé (Robinson et al., 2002). *In vitro*, la stimulation des PMN permet la libération de l'hétérodimère S100A8/A9 complexé à l'AA (Kerkhoff et al., 1999) et le complexe S100A8/A9/AA est reconnu par le CD36, ce qui facilite l'internalisation de l'AA dans les cellules endothéliales (Kerkhoff et al., 2001). Notons que le site de liaison des acides gras à longues chaînes (LCFA) au niveau du CD36 est retrouvé au niveau du segment extracellulaire du récepteur et correspond aux résidus 127-279 (Baillie et al., 1996; Rac et al., 2007). De façon intéressante, ce site de liaison chevauche avec celui des GHRPs au niveau du CD36 (résidus 132-169) (Demers et al., 2004).

## 7.2. Hypothèse de recherche

Étant donné l'importance de l'AA dans la génération des écosanoïdes inflammatoires par l'endothélium (Bogatcheva et al., 2005) et dans l'activation de l'enzyme pro-oxydante NADPHox (Brash et al., 201), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le CD36 microvasculaire, à titre de récepteur pour les protéines inflammatoires S100A8/A9, est en partie responsable de la réponse inflammatoire de la microvasculature.

### 7.3. Objectifs

Nous avons entrepris notre troisième étude afin de répondre aux questions suivantes :

- Est-ce que le récepteur CD36, exprimé par les cellules endothéliales de la microvasculature, régule la réponse inflammatoire microvasculaire et l'accumulation des PMN au niveau des sites inflammatoires?
- Dans l'affirmative, est-ce que l'administration aiguë ou chronique d'un ligand sélectif du CD36, pourrait réduire la migration des PMN au niveau des sites inflammatoires et si oui, par quel mécanisme?

### 7.4. Méthodes

Afin d'élucider le rôle du CD36 de la microvasculature endothéliale dans la modulation de la réponse inflammatoire, nous avons utilisé deux modèles murins d'inflammation aiguë: le modèle de l'ischémie/reperfusion (I/R) des membres inférieurs et le modèle de la poche d'air dorsale. Chez ces modèles, des approches génétique et pharmacologique ont été adoptées, incluant l'utilisation de souris exprimant le CD36 (CD36<sup>+/+</sup>) et de souris déficientes en CD36 (CD36<sup>-/-</sup>), l'utilisation de deux ligands sélectifs du CD36 incluant le EP 80317 dont nous avons déjà démontré les effets anti-inflammatoires dans le modèle de l'athérosclérose (Harb et al., 2009), ainsi que l'utilisation d'anticorps polyclonaux spécifiques, les anti-CD36 et les anti-S100A8/A9. Le modèle d'I/R des membres inférieurs a été choisi parce que c'est un modèle expérimental qui permet de déclencher une réponse inflammatoire systémique et de produire des dommages tissulaires au niveau de divers organes éloignés du tissu



ischémié (Lefer et al., 1993; Yassin et al., 2002; Marzi et al., 2004; Bonheur et al., 2004). La réponse inflammatoire associée au modèle d'I/R est caractérisée par la production de ROS, par l'activation des PMN et par leur recrutement au niveau de différents tissus après la reperfusion (Zimmerman and Granger, 1994). L'importance des cellules endothéliales de la microvasculature dans le recrutement des PMN et dans la médiation des dommages tissulaires associés à l'I/R a été mise en évidence par l'utilisation de la vidéomicroscopie intravitale (Davenpeck et al., 1994; Khandoga et al., 2009; Szabo et al., 2009). L'interaction «cellules endothéliales microvasculaires-leucocytes» est considérée comme une étape-clé limitante dans l'apparition des dommages tissulaires observés dans le modèle d'I/R (Cooper et al., 2002), ce qui rend ce modèle très utile pour l'investigation des effets pro- ou anti-inflammatoires des récepteurs endothéliaux de la microvasculature, tels que le CD36. Le modèle d'I/R offre de plus l'avantage d'induire l'expression des facteurs pro-inflammatoires qui activent la libération de S100A8/A9 à partir des PMN, ce qui nous a permis d'étudier le rôle inflammatoire du CD36 par une interaction avec le complexe S100A8/A9. En effet, l'I/R stimule plusieurs médiateurs pro-inflammatoires dont le fragment activé du complément C5 (C5a) (Collard et al., 1999) qui est un facteur qui induit la relâche de S100A8/A9 *in vitro* (Hetland et al., 1998). De façon intéressante, l'expression des S100A8/A9 a été rapportée dans différents modèles expérimentaux d'I/R. Ainsi, dans le modèle d'I/R du colon, il a été montré que la migration et l'accumulation des PMN au niveau des zones reperfusées corrélaient positivement avec l'expression des hétérodimères S100A8/A9 (calprotectine) et qu'un pic de sécrétion de l'hétérodimère au niveau de ces zones est atteint 30 min suivant la reperfusion (Grosche et al., 2008).

Notons également qu'un rôle pro-inflammatoire de l'AA et des leucotriènes est largement décrit dans les modèles d'I/R des membres inférieurs (Lehr et al., 1993; Noiri et al., 2000; Takamatsu et al., 2004; Jordan et al., 2008; Rossi et al., 2009) et la biosynthèse des leucotriènes par voie transcellulaire est considérée comme une voie de déclenchement et d'exacerbation des réponses inflammatoires dans ce modèle (Sala et al., 1996; Rossoni et al., 1996; Karmazyn et al., 1996; Jordan et al., 2008; Rossi et al., 2009). De plus, la migration et l'accumulation des PMN au niveau des zones reperfusées corrélient positivement avec l'expression de S100A8/A9 (Grosche et al., 2008).

Afin de consolider nos observations et d'approfondir les mécanismes impliqués, nous avons testé notre hypothèse chez le modèle de poche d'air dorsale. Ce modèle a été choisi parce qu'il est bien documenté que la microvasculature dermique exprime le CD36 de façon appréciable (Swerlick et al., 1992). De plus, ce bioessai a été largement utilisé dans la littérature comme un modèle d'inflammation aiguë (D'Ambrosio et al., 2004) permettant d'étudier le recrutement des leucocytes *in vivo* au niveau du foyer inflammatoire induit localement dans la poche dermique (Tessier et al., 1997). Nous avons utilisé des poches d'air au jour 6 puisque ces poches permettent une extravasation des leucocytes et une réponse inflammatoire plus importants que les poches au jour 1 ou 3, suite au développement d'une nouvelle microvasculature (Sedgwick et al., 1983; Sedgwick and Lees, 1986). Le modèle de poche d'air est reconnu comme un modèle valide pour l'étude de la microcirculation durant l'inflammation (Takagi et al., 1987; Greenwald et al., 2001), surtout que les microvaisseaux dermiques de la poche d'air se comportent de la même manière que celle des autres tissus (Takagi et al., 1987). De

plus, ce modèle offre plusieurs avantages par rapport aux autres modèles de l'inflammation (Winyard and Willoughby, 2005; D'Ambrosio et al., 2004) dont la facilité technique de sa réalisation, la possibilité d'injection locale du stimulus inflammatoire étudié, la possibilité de collecter, compter et caractériser les sous-populations de leucocytes ayant migrées dans la poche (Tessier et al., 1997) et la possibilité de collecter les exsudats, d'identifier et de quantifier les molécules (cytokines, chimiokines, écosanoïdes, etc) produites au cours de la réponse inflammatoire (Sedgwick et al., 1986; Tessier et al., 1997; Vandal et al., 2003). De façon intéressante, les études réalisées dans le laboratoire du Dr Philippe Tessier ont montré que l'injection de LPS dans la poche (1 µg/poche) s'accompagne par la sécrétion, dans la poche et dans la circulation, de l'hétérodimère S100A8/A9, une heure suivant l'injection du LPS (Vandal et al., 2003).

### **7.5. Contributions à la publication**

- Mise au point des protocoles expérimentaux et des techniques analytiques.
- Réalisation de la majorité des expériences *in vivo* et *in vitro*.
- Analyse / présentation graphique des résultats.
- Rédaction de l'article.

## 7.6. Résumé

Le CD36, une translocase d'acides gras exprimée par les cellules endothéliales de la microvasculature, est aussi un récepteur pour l'hétérodimère formé par les protéines S100A8/A9. Les protéines S100A8/A9 sont hautement exprimées dans les granulocytes qui infiltrant les sites inflammatoires et sont sécrétées à ce niveau où elles exercent des effets inflammatoires et chimiotactiques. Ces effets sont potentiellement amplifiés par une liaison de haute affinité à l'acide arachidonique (AA) et de son métabolisme transcellulaire par les cellules endothéliales microvasculaires exprimant le CD36. Buts: La présente étude a pour but d'élucider le rôle du CD36 de la microvasculature dans le recrutement des neutrophiles polymorphonucléaires (PMN) au niveau des sites inflammatoires. Méthodes et résultats: Les souris témoins (CD36<sup>+/+</sup>) et déficientes en CD36 (CD36<sup>-/-</sup>) ont été traitées quotidiennement avec le EP 80317 (300 µg/kg), ou avec le véhicule (NaCl 0.9%) par voie s.c. avec un ligand sélectif du CD36, pendant 14 jours avant de les soumettre à une ischémie transitoire (30 minutes) du membre inférieur droit sous anesthésie générale. Les souris ont été sacrifiées après une période de 3 heures de reperfusion. La génération de métabolites réactifs de l'oxygène (ROS) par les leucocytes sanguins activés par le zymosan opsonisé, déterminée par chimioluminescence, montre que l'amorçage des leucocytes sanguins a été réduit de 55% ( $P < 0.05$ ) chez les souris CD36<sup>+/+</sup> traitées avec le EP 80317. Cette réduction est accompagnée par une diminution de 43-70% de l'accumulation des PMN après la reperfusion au niveau des divers organes éloignés du site ischémié. L'injection i.p. d'anticorps neutralisants anti-S100A8/A9 a aussi réduit l'activation des leucocytes circulants de 52% ( $P < 0.05$ ), de même que l'accumulation des PMN pulmonaires par 69% ( $P < 0.05$ ) par comparaison

au groupe de souris traitées par le véhicule, 3 heures après la reperfusion du membre inférieur. L'administration concomitante des anticorps anti-S100A8/A9 et du EP 80317 n'a pas montré d'effet additif sur la réduction du recrutement des PMN au niveau des divers tissus reperfusés. Comparées aux souris CD36<sup>+/+</sup>, les souris CD36<sup>-/-</sup> ont montré une réduction de la génération de ROS par les leucocytes sanguins et l'accumulation tissulaire des PMN en réponse à l'I/R du membre inférieur droit?. De plus, ni le EP 80317 ni les anticorps anti-S100A8/A9 n'ont exercé d'effet sur l'accumulation des PMN en absence de l'expression du récepteur CD36. Afin de mieux caractériser le rôle du CD36 dans le recrutement des PMN au niveau des sites inflammatoires, nous avons utilisé le modèle de poche d'air dorsale stimulée par le lipopolysaccharide bactérien (LPS). Un prétraitement avec le EP 80317 ou avec les anticorps anti-CD36 a réduit de 53 et 57%, respectivement, l'accumulation des PMN induite par l'injection de LPS au niveau des poches sous-cutanées alors que les anticorps anti-S100A8/A9 ont réduit cette accumulation de 58%. Chez les souris CD36<sup>-/-</sup>, l'accumulation de PMN n'a pas été modifiée par l'administration des anticorps anti-CD36 ou anti-S100A8/A9. Nos résultats suggèrent que le CD36 exprimé par les cellules endothéliales de la microvasculature module le recrutement des PMN au niveau des sites inflammatoires. Conclusions: Nos résultats suggèrent un rôle potentiel pour l'hétérodimère S100A8/A9, sécrété par les neutrophiles activés à l'interface PMN-endothélium, dans la réponse inflammatoire médiée par le CD36. Le ciblage du CD36 pourrait représenter une nouvelle stratégie pour limiter les dommages tissulaires associés à l'accumulation des PMN au niveau des sites inflammatoires.

**Microvascular endothelial CD36 regulates polymorphonuclear leukocyte trafficking to acute inflammatory sites in mice: a role for myeloid-related proteins S100A8/A9**

**Diala Harb<sup>1</sup>, David N. Huynh<sup>1</sup>, Katia Mellal<sup>1</sup>, Pierre Borgeat<sup>2</sup>, Philippe Tessier<sup>3</sup>, Huy Ong<sup>1</sup> and Sylvie Marleau<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Infectious Diseases Research Center, <sup>3</sup>Rheumatology and Immunology Research Center, Laval University Hospital Center, Québec, Canada

Short title: Role of microvascular CD36 in PMN recruitment

\* Corresponding author: Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, P.O.Box 6128, Station Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

## Abstract

CD36, a fatty acid translocase expressed by microvascular endothelial cells, is also a putative receptor for the myeloid-related protein heterodimer S100A8/A9, a high affinity binding protein for endogenous arachidonic acid (AA). S100A8/A9 proteins are expressed at high levels by granulocytes infiltrating inflammatory lesions and are secreted at sites of inflammation where they exert inflammatory and chemotactic effects.

**Aim:** The present study aimed to delineate the role of microvascular endothelial CD36 in regulating the polymorphonuclear neutrophils (PMN) trafficking to acute inflammatory sites. **Methods and Results:** Control mice expressing CD36 (CD36<sup>+/+</sup>) and those deficient in CD36 (CD36<sup>-/-</sup>) were treated daily with a s.c. injection of EP 80317 (300 µg/kg) or with the vehicle (0.9% NaCl) for 14 days after which mice were subjected to unilateral hind limb ischemia (30 min) under general anesthesia. Mice were sacrificed after a 3-hour reperfusion period. Generation of reactive oxygen species (ROS) by blood leukocytes, as assessed by the inhibition of opsonized zymosan-elicited ROS formation in chemiluminescence assays, show that systemic priming of blood leukocytes was reduced by 55% ( $P < 0.05$ ) in EP 80317-treated CD36<sup>+/+</sup> mice. Intraperitoneal injection with S100A8/A9 polyclonal neutralizing antibodies also reduced blood leukocyte stimulated-chemiluminescence by 52% ( $P < 0.05$ ) and PMN recruitment to the lungs by 69% ( $P < 0.05$ ) 3 hours after reperfusion of ischemic limbs. Yet, the combined administration of S100A8/A9 antibodies and EP 80317 did not exert additional inhibitory effects on remote tissue PMN recruitment. CD36<sup>-/-</sup> mice showed a blunted response to I/R-induced remote tissue injury, and neither EP 80317 nor S100A8/A9 further reduced PMN tissue accumulation. To further characterize the

contribution of microvascular CD36 to PMN recruitment at inflammatory sites, air pouches were raised on mice dorsum and LPS was injected into the pouches to elicit PMN accumulation. Systemic pretreatment of mice with EP 80317 or with anti-CD36 polyclonal antibodies significantly reduced LPS-elicited PMN recruitment, as shown by a reduction of 53 and 57% PMN numbers in sub-cutaneous pouches, respectively, whereas anti-S100A8/A9 antibodies reduced PMN accumulation by 58%. Combining anti-CD36 and anti-S100A8/A9 antibodies did not further reduce pouches PMN numbers while the treatments, alone or combined, did not modulate PMN trafficking to LPS-injected pouches in CD36<sup>-/-</sup> mice. **Conclusions:** Our results strongly support a potential role for the heterodimer S100A8/A9, secreted by activated neutrophils upon the contact with the endothelium, in the inflammatory response mediated by CD36. Targeting CD36 might represent a novel strategy for limiting inflammatory injury associated with PMN accumulation.



## 1. Introduction

CD36 is a class B scavenger receptor expressed by multiple cell types, such as macrophages, platelets, adipocytes, epithelial cells and microvascular endothelial cells (Silverstein and Febbraio, 2009). CD36, also known as fatty acid translocase (FAT), shows high affinity binding towards lipid-based ligands such as oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) (Nicholson et al., 1995) and long chain-fatty acids (LCFA) (Coburn et al., 2000), among others. These multiple ligands/receptor interactions elicit a wide variety of pathophysiological processes, including atherosclerosis and atherothrombosis, diabetes, stroke, Alzheimer's disease, angiogenesis and cancer, with inflammation as a commonality (Silverstein and Febbraio, 2009). The pro-inflammatory nature of CD36 signaling has been uncovered in atherosclerosis (Harb et al., 2009; Park et al., 2009) and cerebral ischemia (Cho et al., 2005; Kim et al., 2008; Kunz et al., 2008), as well as in degenerative brain diseases (El Khoury et al., 2003; Su et al., 2008). CD36 function in microvascular endothelial cells appears to be mainly related to angiogenesis (Simantov et al., 2005) but may also lead to increased uptake of oxidized lipoprotein uptake in pathological circumstances such as in glucose-elicited microvascular CD36 up-regulation (Farhangkhoe et al., 2005). Yet, whether CD36 contributes to acute inflammatory conditions has not been investigated thoroughly.

S100A8/A9 heterodimers are expressed and secreted at high levels by activated granulocytes infiltrating inflammatory lesions (Hessian et al., 1993; Ryckman et al., 2003) and upon binding to inflamed endothelium (Rammes et al., 1997; Frosch et al., 2000). For instance, differentiation of HL-60 cells to neutrophil-like cells causes the secretion of S100A8/A9/AA-bound complexes (Kerkhoff et al., 1999) which may

thereby facilitate AA transfer to neighbouring cells, including endothelial cells (Kerkhoff et al., 2001; Eue and Sorg, 2001; Kannan, 2003). Transcellular metabolism of AA by microvascular endothelium may lead to eicosanoid biosynthesis (Folco and Murphy, 2006) which further promotes polymorphonuclear neutrophils (PMN) accumulation to inflammatory loci. Alternatively, internalized AA may stimulate ROS production through NADPH oxidase activation (Bouzidi et al., 2004). Given that S100A8/A9 may bind to microvascular CD36 in acute inflammatory states, we hypothesized that CD36 may regulate leukocyte recruitment to inflammatory sites *in vivo*.

In the present study, the role of CD36 in regulating PMN recruitment to inflammatory sites was addressed using both genetic and pharmacological approaches in a bioassay (air pouch) and acute inflammatory model of hind limb ischemia and reperfusion (I/R) in mice. The latter has been associated with systemic leukocyte priming and activation, PMN accumulation and tissue injury in remote, well-perfused organs (Yassin et al., 2002). Our results support a role for microvascular CD36 in the regulation of PMN trafficking to inflammatory sites.

## **2. Methods**

### **2.1. Materials**

All solutions for parenteral administration were reconstituted with pyrogen-free, sterile 0.9% NaCl (Baxter Corporation, Toronto, Ontario, Canada) or PBS (Gibco Life Technologies, GrandIsland, NY). EP 80317 (Haic-D2MeTrp-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>) and EP 80318 (Atab-D2MeTrp-DLys-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>), were provided by

Europeptides (Argenteuil, France). Heparin was from Organon (Toronto, Ontario, Canada). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) was purchased from Wisent Bioproducts (St-Bruno, Québec, Canada). Modified Hanks' balanced salt solution (HBSS) was from Gibco. Hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), Hepes, luminol, zymosan A and lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* O111:B4) were from Sigma (St Louis, MO, USA). The rabbit polyclonal anti-CD36 antibody (A371) was produced in house, the rabbit polyclonal anti-S100A8 and anti-S100A9 were prepared as previously described (Vandal et al., 2003), and the non specific rabbit IgGs (#I5006) was purchased from Sigma. The biotinylated goat anti-rabbit IgGs (BA-1000) were purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA).

## **2.2. Animals**

Mice were kindly provided by Dr Maria Febbraio and backcrossed 6 times to a C57Bl/6 background as reported previously (Harb et al., 2009). Experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines, conforming to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (A5213-01). For hind limb I/R experiments, four weeks old male apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> mice and their littermate controls were fed normal chow or high fat high cholesterol (HFHC) diet (D12108, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) until subjected to transient unilateral hind limb ischemia at 18 weeks old. For dorsal air pouches bioassay, twelve to fifteen weeks old mice were used.

### 2.3. Unilateral hind limb ischemia and reperfusion in mice

ApoE-deficient mice (16-week-old) (apoE<sup>-/-</sup>) and apoE/CD36 double-deficient mice (apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup>) were pretreated with 300 µg/kg daily s.c. of EP 80317 or EP 80318 (Harb et al., 2009; Marleau et al., 2005) or with 0.9% NaCl vehicle as illustrated in Figure 1A. All experiments were performed in isoflurane-anaesthetized mice. Mice were subjected to 30 minutes ischemia of the right hind limb induced by the application of a rubber band tourniquet above the greater trochanter using a McGivney hemorrhoidal ligator, followed by 3-hour reperfusion before sacrifice. In some experiments, mice were injected i.p. with anti-S100A8 and anti-S100A9 proteins (1 mg of each) (Vandal et al., 2003; Raquil et al., 2008) or with non specific rabbit IgG, 16 hours prior to limb ischemia (Figure 1B). Blood samples (50-100 µl) were withdrawn from the jugular vein into heparin tubes (20 USP/ml blood), 5 minutes prior to sacrifice, kept on ice and assayed within 30 minutes for opsonized zymosan (OpZ)-elicited whole blood chemiluminescence. After sacrifice, tissues including the right lung and liver lobes, jejunum, and the non ischemic (contralateral) skeletal muscle were rapidly dissected, snap-frozen on dry ice and stored at -80°C until assayed for myeloperoxidase (MPO) activity.

### 2.4. Bioassay of PMN accumulation in dorsal air pouches

Air pouches were raised on the dorsum of CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice by s.c. injection of 3 ml of sterile air filtered on a 0.22 µm filter on days 0 and 3. On day 6, mice received, via the jugular vein, 50 µg of anti-CD36 or non specific IgG or 300 µg/kg EP 80317 (Figure 1C). One hour later, 1 ml of LPS (1 µg/ml) or 0.9% NaCl was injected into the

air pouches. In additional experiments, mice were injected i.p. with a mixture of anti-S100A8 and anti-S100A9 (1 mg each) or non specific IgG (2 mg), 16 hours prior to LPS injection in the air pouch (Figure 1D). After 4 hours of accumulation, the air pouches were washed with 6 ml of ice-cold saline containing 10 USP heparin/ml. Blood (~1 ml) was collected by cardiac puncture. Air pouch skin (for microvessels isolation) was harvested following sacrifice. Total and differential leukocyte numbers were determined in Turk's stain solution and Wright-Giemsa-stained cytopins, respectively.

## **2.5. Whole blood chemiluminescence assay**

Luminol-enhanced chemiluminescence of whole blood samples was assayed using a Chronolog Lumi-Aggregometer (model 500-Ca, Chrono-log Corporation, Havertown, PA). Briefly, OpZ was prepared by incubating rat serum with zymosan A (10 mg/ml) for 1 hour at 37°C. Blood was diluted 1/10 in DMEM containing 50 mM Hepes (pH 7.4) and a 200 µl aliquot was incubated at 37°C for 5 min prior to the addition of 100 µl luminol (final concentration of 88 nM). Respiratory burst was initiated by the addition of OpZ (final concentration of 4.5 µg/µl) and the chemiluminescence response was recorded using the Aggrolink Software (Chrono-log Corporation), quantified as the peak amplitude determined at the plateau. Data were normalized for total blood leukocyte numbers.

## **2.6. Tissue MPO assay**

Tissue MPO activity was assayed as previously described, with slight modifications (Tremblay et al., 2000; Bélanger et al., 2008). Briefly, tissues were homogenized in 1 ml

acetate buffer (100 mM), pH 6, containing 1% HTAB and 20 mM EDTA. Homogenates were heated to 65°C for 2 hours, subjected to 3 freeze–thaw cycles and then centrifuged at 2000 x g for 10 min. MPO was assayed by incubating supernatants with 3.2 mM TMB and 1.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 100 µl of 0.2 M sodium acetate (pH 3). Mouse MPO standards were prepared using PMN harvested from the peritoneal cavity of donor animals injected i.p. with 2 ml of 5% casein 16 hours prior to sacrifice, and purified by positive selection (> 98% PMN) using an anti-Ly-6G magnetic MicroBead Kit (Milenyi Biotec, Auburn, CA), according to manufacturer's instructions. Hypotonic lysis of red blood cell was performed (cells resuspended in 0.2% NaCl for 20 seconds, followed by the addition of an equal volume of 1.6% NaCl), and aliquots of neutrophils (10<sup>6</sup> cells/ml acetate buffer/1% HTAB/20 mM EDTA) were stored at -80°C. Thawed aliquots were homogenised, incubated at 65°C for 2 hours, centrifuged at 2000 x g for 10 min, and the supernatants were used to construct a MPO calibration curve. The equivalent numbers of PMN per tissue homogenate were calculated from the standard curve and normalized for total blood leukocyte counts.

## **2.7. Western blots**

Air pouch skin microvessels were dissected and dermal microvascular endothelial cells (dMEC) were isolated as previously described (Cha et al., 2005). Proteins were extracted with radioimmune precipitation assay (RIPA) buffer containing a protease cocktail (Complete®, Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). Proteins (80 µg) were separated on a 7.5% SDS-PAGE gel, transferred to nitrocellulose membranes and

incubated overnight with A371 rabbit polyclonal antibody against CD36 (1/1000). The membranes were washed with Tris-buffered saline (pH 7.4) containing 0.05% Tween 20 (TBS-T) and incubated with goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated second antibody (1/10000) for 1 hour. The reaction was visualized by enhanced chemiluminescence (ECL plus, Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada) and signals were analyzed with ImageQuant 5.2 software (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

## **2.8. Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were performed using a one-way analysis of variance followed by pair-wise multiple comparisons using the Student-Newman-Keuls test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## **3. Results**

### **3.1. Systemic administration of selective CD36 ligands reduced PMN accumulation in remote organs following hind limb I/R, in a CD36-dependent manner**

Three hours of reperfusion of the right ischemic limb in mice fed normal chow was associated with remote tissue injury, characterized by a 9-fold increase in PMN accumulation in the lungs, from  $2.5 \pm 0.9$  to  $23.3 \pm 5.7 \times 10^6$  PMN/g lung in shams and 0.9% NaCl-treated CD36<sup>+/+</sup> mice, respectively ( $P < 0.01$ ) (Figure 2A, left panel). Pretreatment (14 days) with either EP 80317 or EP 80318 as synthetic selective CD36 ligands reduced PMN accumulation in lungs by 66 and 56% ( $P < 0.05$ ), respectively, compared to vehicle-treated mice (Figure 2A, left panel). Similar results were observed

when mice were fed a HFHC diet, as shown by a 54% ( $P < 0.05$ ) reduction in lung PMN in EP 80317 versus vehicle-treated mice (Figure 2A, right panel). A single dose of EP 80317 had similar protective effect against remote tissue PMN recruitment following acute hind limb I/R, as assessed by a 49% ( $P < 0.05$ ) reduction in lung PMN accumulation (data not shown). Sham-operated CD36-deficient mice showed similar basal lung PMN numbers compared to CD36<sup>+/+</sup> mice ( $2.7 \pm 0.7$  and  $4.2 \pm 0.5 \times 10^6$  PMN/g lung in CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice, respectively; NS) (Figure 2A and 2B). In contrast, hind limb I/R-elicited remote PMN recruitment to the lungs was lower in CD36<sup>-/-</sup> mice, as shown by a 2.4-fold ( $P < 0.05$ ) increase in PMN numbers in vehicle-treated mice compared to sham-operated mice. Treatment with EP 80317 did not further reduced PMN recruitment (Figure 2B). Similar observations were made after a single dose of EP 80317 (data not shown).

EP 80317- and EP 80318-pretreated CD36<sup>+/+</sup> mice showed reduced (~ 43-70%) PMN recruitment to other remote tissues including the liver and contralateral skeletal muscle (Figure 3A). A similar tendency was observed for jejunum (Figure 3A). In agreement with blunted I/R-elicited PMN recruitment to the lungs of CD36<sup>-/-</sup> mice, PMN accumulation in these mice was also reduced to other remote tissues including the liver and the contralateral muscle (Figure 3B). In contrast to the inhibitory effect of EP 80317 on PMN recruitment to inflamed organs in CD36<sup>+/+</sup> mice, EP 80317 administration in CD36<sup>-/-</sup> mice did not modulate PMN trafficking (Figure 3B).



### **3.2. Blockade of S100A8/A9 activity reduced PMN activation and remote tissue accumulation in a CD36-dependent manner**

In order to delineate the role of S100A8/A9 heterodimers as endogenous CD36 ligands in the regulation of PMN trafficking to remote inflammatory sites, mice were injected i.p. with either a mixture of neutralizing anti-S100A8 and anti-S100A9 IgGs, or nonspecific rabbit IgGs, 16 hours before the induction of unilateral hind limb I/R. Whereas vehicle-treated mice showed a 7.5 fold ( $P < 0.01$ ) increase in PMN accumulation compared to sham-operated mice, pretreatment with either S100A8/A9 neutralizing antibodies or EP 80317 reduced PMN recruitment to the lungs by 69% ( $P < 0.05$ ) (Figure 4A). No additive effect was observed by combining the two treatments (Figure 4A). Neither EP 80317 nor anti-S100A8/A9 antibodies further reduced PMN accumulation in CD36<sup>-/-</sup> mice (Figure 4B).

Hind limb I/R injury was associated with circulating blood leukocytes priming and/or activation, as shown by a 3.6-fold increase ( $P < 0.05$ ) in OpZ-stimulated whole blood chemiluminescence in vehicle-treated mice compared to sham-operated mice (data not shown). Pretreatment of CD36<sup>+/+</sup> mice with EP 80317, anti-S100A8/A9 or a combined administration of EP 80317 and anti-S100A8/A9 reduced ROS generation by 55%, 52% and 51% ( $P < 0.05$ ), respectively (Figure 4C). In contrast, Opz-stimulated whole blood chemiluminescence was blunted in CD36<sup>-/-</sup> (Figure 4D) and neither of the treatments further reduced ROS generation (Figure 4D).

### 3.3. Microvascular CD36 is involved in LPS-elicited PMN recruitment in the mouse air pouch

The role of microvascular endothelial CD36 in regulating PMN trafficking to dorsal air pouches was investigated using specific CD36 ligands or antibodies in LPS-stimulated air pouch. As reported previously (Swerlick et al., 1992), CD36 was found to be expressed in dermal microvascular vessels in CD36<sup>+/+</sup> mice (Figure 5A). As expected, no CD36 expression was found in CD36<sup>-/-</sup> mice (Figure 5A).

Leukocyte recruitment to the pouch was elevated by 5.5-fold compared to 0.9% NaCl 4 hours after LPS injection in the dorsal pouch (1 µg) of CD36<sup>+/+</sup> mice (Figure 5B). An i.v. bolus of EP 80317 (300 µg/kg), injected 1 hour prior to LPS injection, reduced pouch PMN numbers by 53% ( $P < 0.05$ ) while the i.v. injection of 50 µg of a neutralizing anti-CD36 antibody reduced pouch PMN accumulation by 57% ( $P < 0.05$ ) (Figure 5B). In a similar manner, anti-S100A8/A9 antibodies (1 mg each) reduced pouch PMN numbers by 58% ( $P < 0.05$ ) (Figure 5B). The combined administration of anti-CD36 and anti-S100A8/A9 antibodies reduced PMN recruitment by 56% ( $P < 0.05$ ) (Figure 5B). In contrast, LPS-elicited PMN recruitment was blunted in CD36<sup>-/-</sup> mice compared to CD36<sup>+/+</sup> mice (Figure 5C); pretreatment with EP 80317 and/or anti-S100A8/A9 did not further inhibit leukocyte recruitment to the pouch (Figure 5C).

## 4. Discussion

The principal finding of this study is the demonstration of a role for microvascular FAT/CD36 in the regulation of PMN trafficking to inflammatory sites. We further provide evidence for a role of the S100A8/A9 heterodimers as putative CD36 ligands

involved in the transport of arachidonic acid and/or lipid mediators to microvascular endothelium.

CD36 was shown to bind S100A8/A9 protein heterodimers (Kerkhoff et al., 2001), the latter acting as a main carrier protein for AA (Kerkhoff et al., 1999). Indeed, S100A8/A9 heterodimers are secreted by activated PMN (Frosch et al., 2000; Hetland et al., 1998), and thus are well located to provide AA for transcellular metabolism by neighbouring endothelial cells. Endothelial AA may then be metabolized to leukotrienes or prostaglandins (Folco and Murphy, 2006), or may bind to gp91<sup>phox</sup> leading to the activation of NADPHox (Kerkhoff et al., 2005).

Microvascular endothelial CD36 up-regulated by hyperglycemia has been linked to oxidative DNA damage and endothelial dysfunction (Farhangkhoei et al., 2005). In line with these observations, our results uncovered a novel pro-inflammatory role for CD36 in the regulation of PMN trafficking to acute inflammatory sites. The evidence was provided by showing 1) that PMN recruitment to remote tissues was reduced by 43-70% in mice treated with EP80317 in both hind limb I/R-elicited PMN trafficking to remote organs and LPS-elicited PMN accumulation in air pouches; 2) by showing that CD36<sup>-/-</sup> mice were protected from I/R-mediated tissue injury. Furthermore, EP 80317 did not prevent PMN accumulation in CD36<sup>-/-</sup> mice.

The pivotal role of CD36 in facilitating long chain fatty acid (LCFA) uptake, either through a direct interaction with the fatty acid or by cooperating with other fatty acid binding proteins, has been well studied in cell types such as adipocytes and cardiomyocytes (Eyre et al., 2007). Our results support such a role in endothelial cells, where CD36 may facilitate the uptake of fatty acids such as AA (Kerkhoff et al., 2001),

thus contributing to the inflammatory response. A crucial role for microvascular endothelial cells, through cell adhesion molecules expression, ROS generation, lipid mediators and chemokine biosynthesis in regulating PMN trafficking to acute inflammatory sites has been well documented (Eppihimer and Granger, 1997). In addition to these known inflammatory regulators, CD36 appears to be critical in regulating PMN trafficking to inflammatory sites, acting either as a receptor for the chemotactic proteins S100A8/A9 and/or by generating endothelial inflammatory mediators through the transfer of AA (Folco et al., 2006). Alternatively, endothelial AA may enhance ROS generation (Kerkhoff et al., 2005).

Hind limb I/R in mice has been shown to elicit remote tissue injury in a leukocyte- and leukotriene-dependent manner in rodents (Klausner et al., 1988). In addition to AA metabolites (Hossain et al., 2006; Rossi et al., 2009), chemotactic factors including TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, PAF and C5a (Collard and Gelman, 2001) and reactive oxygen species (Cooper et al., 2002) have been proposed to contribute to the inflammatory response following hind limb I/R. Activated leukocytes are themselves a rich source of pro-inflammatory mediators, including the S100A8 and S100A9 proteins which are expressed in large quantity (Hessian et al., 1993). *In vivo*, S100A8/A9 heterodimers have been shown to be secreted from activated leukocytes at inflammatory loci (Stirz and Trebichavsky, 2004), and have been detected on the endothelium in inflamed tissues (Robinson et al., 2002), as well as in inflammatory conditions such as in ischemic brain lesions (Postler et al., 1997) and in the bronchoalveolar fluid of inflammatory lungs (Lorenz et al., 2008). Interestingly, in the equine colon model of I/R, the number of

S100A8/A9-positive cells within submucosal venules correlated significantly with the accumulation of PMN, and secretion of S100A8/A peaked after 30 min of reperfusion (Grosche et al., 2008). Our results support a novel role for microvascular CD36 in regulating PMN trafficking to remote organs following hind limb I/R through the binding of endogenous S100A8/A9/AA complexes inasmuch as PMN recruitment to the lungs was reduced by specific polyclonal anti-S100A8/A9 antibodies in CD36<sup>+/+</sup> mice, but not in CD36<sup>-/-</sup> mice. In addition, treatment with a CD36 antibody attenuated PMN accumulation to almost the same level, while combining anti-CD36 and anti-S100A8/A9 blockade did not exert additive or synergistic effect. It is worthy of note that CD36<sup>-/-</sup> mice presented a blunted response to PMN accumulation in all remote tissues (Figure 2 and 3), supporting an important role for endothelial CD36 in regulating PMN recruitment to remote organs and tissues. Interestingly, cerebral ischemia and reperfusion has also been associated with CD36 upregulation and PMN infiltration in brain tissue (Cho et al., 2005; Kunz et al., 2008). Yet, in this model, the ligands mediating CD36 activation following brain I/R remain unknown (Kunz, 2008). It might be of interest to investigate the potential role of the S100A8/A9 proteins in cerebral ischemia and reperfusion.

To further assess the role of microvascular CD36 in regulating PMN trafficking to inflammatory sites, the effect of CD36 and/or S100A8/A9 blockade was assessed in LPS-stimulated PMN trafficking to dorsal air pouches, inasmuch as dermal microvessels are known to express endothelial CD36 (Swerlick et al., 1992) and Figure 5A, and that LPS-stimulated pouches are associated with elevated S100A8/A9 in pouch

exudates and serum (Vandal et al., 2003). Our results show that the systemic administration of either EP 80317, anti-CD36 or of anti-S100A8/A9 antibodies reduced PMN accumulation in air pouches of CD36<sup>+/+</sup> mice by ~56%, whereas combined treatments had no additive effects. As shown in hind limb I/R-elicited PMN trafficking to the lungs, LPS-elicited PMN recruitment in dorsal pouches of CD36<sup>-/-</sup> mice was blunted, and furthermore, none of the treatments further inhibited PMN accumulation, thus supporting an important role for endothelial CD36 in regulating PMN recruitment into inflammatory loci.

Altogether, our results led us to propose the following scheme of events (Figure 6). Activated phagocytes release S100A8/A9/AA complexes which bind microvascular endothelial CD36 at inflammatory sites thus providing AA for transcellular uptake. AA may then activate endothelial NADPH oxidase, which share similar structure and subunits with the phagocyte oxidase (Sorescu et al., 2001), leading to ROS generation. Alternatively AA, or else LTA4, may be used for transcellular metabolism and endothelial eicosanoid biosynthesis. Indeed, LTA4 was also shown to be stabilized in the extracellular compartment by the S100A8/A9 complex (Rector and Murphy, 2009), and made available for transcellular metabolism (Rector and Murphy, 2009). Endothelial cells may therefore generate LTB4 (Claesson and Haeggstrom, 1988), one of the most potent chemotactic agents and activators of PMN (Marleau et al., 1999), in acute inflammatory conditions including I/R (Karmazyn, 1996). Therefore, interfering with CD36 function, or S100A8/A9 blockade, may potentially lead to reduced ROS

and/or pro-inflammatory AA metabolites. The molecular mechanisms involved in CD36 regulation of PMN trafficking are yet to be investigated.

In conclusion, our data suggest that CD36 expressed by microvascular endothelial cells regulates PMN trafficking to inflammatory sites by interacting with S100A8/A9 heterodimers. Synthetic CD36 ligands may represent a novel class of therapeutic molecules which prevent and attenuate tissue injury associated with the recruitment of PMN to inflamed tissues.

### **Funding**

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) [MOP-62837 to H.O. and S.M.]; Ardana Bioscience, Edinburgh, UK [to H.O. and S.M.]; and by scholarships from the CIHR/Rx&D and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec [to D.H.] and the Groupe de recherche universitaire sur le médicament [to D.N.H.].

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to Jessica Fiset for technical assistance.

### **Conflict of interest**

None declared

## References

- Silverstein, R. L., Febbraio, M. (2009) CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci.Signal.* 2, re3
- Nicholson, A. C., Frieda, S., Pearce, A., Silverstein, R. L. (1995) Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15, 269-275
- Harb, D., Bujold, K., Febbraio, M., Sirois, M. G., Ong, H., Marleau, S. (2009) The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovasc.Res.* 83, 42-51
- Park, Y. M., Febbraio, M., Silverstein, R. L. (2009) CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J.Clin.Invest* 119, 136-145
- Cho, S., Park, E. M., Febbraio, M., Anrather, J., Park, L., Racchumi, G., Silverstein, R. L., Iadecola, C. (2005) The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. *J.Neurosci.* 25, 2504-2512
- Kim, E., Tolhurst, A. T., Qin, L. Y., Chen, X. Y., Febbraio, M., Cho, S. (2008) CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury. *J.Neurosci.* 28, 4661-4670
- Kunz, A., Abe, T., Hochrainer, K., Shimamura, M., Anrather, J., Racchumi, G., Zhou, P., Iadecola, C. (2008) Nuclear factor-kappaB activation and postischemic inflammation are suppressed in CD36-null mice after middle cerebral artery occlusion. *J.Neurosci.* 28, 1649-1658



- El Khoury, J. B., Moore, K. J., Means, T. K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M. W., Luster, A. D. (2003) CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J.Exp.Med.* 197, 1657-1666
- Su, X., Maguire-Zeiss, K. A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K., Federoff, H. J. (2008) Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol.Aging* 29, 1690-1701
- Simantov, R., Febbraio, M., Silverstein, R. L. (2005) The antiangiogenic effect of thrombospondin-2 is mediated by CD36 and modulated by histidine-rich glycoprotein. *Matrix Biol.* 24, 27-34
- Farhangkhoei, H., Khan, Z. A., Barbin, Y., Chakrabarti, S. (2005) Glucose-induced up-regulation of CD36 mediates oxidative stress and microvascular endothelial cell dysfunction. *Diabetologia* 48, 1401-1410
- Hessian, P. A., Edgeworth, J., Hogg, N. (1993) MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc.Biol* 53, 197-204
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., Tessier, P. A. (2003) Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol.* 170, 3233-3242
- Rammes, A., Roth, J., Goebeler, M., Klempt, M., Hartmann, M., Sorg, C. (1997) Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* 272, 9496-9502
- Frosch, M., Strey, A., Vogl, T., Wulffraat, N. M., Kuis, W., Sunderkotter, C., Harms, E., Sorg, C., Roth, J. (2000) Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted

during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis.

*Arthritis Rheum.* 43, 628-637

Kerkhoff, C., Klempt, M., Kaever, V., Sorg, C. (1999) The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J.Biol.Chem.* 274, 32672-32679

Kerkhoff, C., Sorg, C., Tandon, N. N., Nacken, W. (2001) Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells. *Biochemistry* 40, 241-248

Eue, I., Sorg, C. (2001) Arachidonic acid specifically regulates binding of S100A8/9, a heterodimer complex of the S100 class of calcium binding proteins, to human microvascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 154, 505-508

Kannan, S. (2003) Inflammation: a novel mechanism for the transport of extracellular nucleotide-induced arachidonic acid by S100A8/A9 for transcellular metabolism. *Cell Biol Int.* 27, 593-595

Folco, G., Murphy, R. C. (2006) Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol.Rev.* 58, 375-388

Bouzidi, F., Doussiere, J. (2004) Binding of arachidonic acid to myeloid-related proteins (S100A8/A9) enhances phagocytic NADPH oxidase activation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 325, 1060-1065

Yassin, M. M., Harkin, D. W., Barros D'Sa, A. A., Halliday, M. I., Rowlands, B. J. (2002) Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J.Surg.* 26, 115-121

- Vandal, K., Rouleau, P., Boivin, A., Ryckman, C., Talbot, M., Tessier, P. A. (2003) Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 171, 2602-2609
- Marleau, S., Harb, D., Bujold, K., Avallone, R., Iken, K., Wang, Y., Demers, A., Sirois, M. G., Febbraio, M., Silverstein, R. L., Tremblay, A., Ong, H. (2005) EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J.* 19, 1869-1871
- Raquil, M. A., Anceriz, N., Rouleau, P., Tessier, P. A. (2008) Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia. *J.Immunol.* 180, 3366-3374
- Tremblay, P. B., Macari, D. M., Martel, D., du, S. P., Barja-Fidalgo, C., Marleau, S. (2000) Hypoxemia modifies circulating and exudate neutrophil number and functional responses in carrageenin-induced pleurisy in the rat. *J.Leukoc.Biol.* 67, 785-792
- Belanger, C., Elimam, H., Lefebvre, J., Borgeat, P., Marleau, S. (2008) Involvement of endogenous leukotriene B4 and platelet-activating factor in polymorphonuclear leucocyte recruitment to dermal inflammatory sites in rats. *Immunology* 124, 295-303
- Cha, S. T., Talavera, D., Demir, E., Nath, A. K., Sierra-Honigmann, M. R. (2005) A method of isolation and culture of microvascular endothelial cells from mouse skin. *Microvasc.Res.* 70, 198-204
- Swerlick, R. A., Lee, K. H., Wick, T. M., Lawley, T. J. (1992) Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J.Immunol.* 148, 78-83

- Hetland, G., Talgo, G. J., Fagerhol, M. K. (1998) Chemotaxins C5a and fMLP induce release of calprotectin (leucocyte L1 protein) from polymorphonuclear cells in vitro. *Mol.Pathol.* 51, 143-148
- Kerkhoff, C., Nacken, W., Benedyk, M., Dagher, M. C., Sopalla, C., Doussiere, J. (2005) The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *FASEB J.* 19, 467-469
- Eyre, N. S., Cleland, L. G., Tandon, N. N., Mayrhofer, G. (2007) Importance of the carboxyl terminus of FAT/CD36 for plasma membrane localization and function in long-chain fatty acid uptake. *J.Lipid Res.* 48, 528-542
- Eppihimer, M. J., Granger, D. N. (1997) Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules. *Shock* 8, 16-25
- Klausner, J. M., Paterson, I. S., Valeri, C. R., Shepro, D., Hechtman, H. B. (1988) Limb ischemia-induced increase in permeability is mediated by leukocytes and leukotrienes. *Ann.Surg.* 208, 755-760
- Hossain, M. A., Wakabayashi, H., Izuishi, K., Okano, K., Yachida, S., Maeta, H. (2006) The role of prostaglandins in liver ischemia-reperfusion injury. *Curr.Pharm Des* 12, 2935-2951
- Rossi, A., Cuzzocrea, S., Sautebin, L. (2009) Involvement of leukotriene pathway in the pathogenesis of ischemia-reperfusion injury and septic and non-septic shock. *Curr.Vasc Pharmacol.* 7, 185-197
- Collard, C. D., Gelman, S. (2001) Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 94, 1133-1138

- Cooper, D., Stokes, K. Y., Tailor, A., Granger, D. N. (2002) Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc.Toxicol.* 2, 165-180
- Striz, I., Trebichavsky, I. (2004) Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 53, 245-253
- Robinson, M. J., Tessier, P., Poulson, R., Hogg, N. (2002) The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem.* 277, 3658-3665
- Rugtveit, J., Scott, H., Halstensen, T. S., Norstein, J., Brandtzaeg, P. (1996) Expression of the L1 antigen (calprotectin) by tissue macrophages reflects recent recruitment from peripheral blood rather than upregulation of local synthesis: implications for rejection diagnosis in formalin-fixed kidney specimens. *J Pathol.* 180, 194-199
- Lorenz, E., Muhlebach, M. S., Tessier, P. A., Alexis, N. E., Duncan, H. R., Seeds, M. C., Peden, D. B., Meredith, W. (2008) Different expression ratio of S100A8/A9 and S100A12 in acute and chronic lung diseases. *Respir.Med.* 102, 567-573
- Grosche, A., Morton, A. J., Polyak, M. M., Matyjaszek, S., Freeman, D. E. (2008) Detection of calprotectin and its correlation to the accumulation of neutrophils within equine large colon during ischaemia and reperfusion. *Equine Vet.J* 40, 393-399
- Sorescu, D., Szocs, K., Griendling, K. K. (2001) NAD(P)H oxidases and their relevance to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc.Med.* 11, 124-131
- Rector, C. L., Murphy, R. C. (2009) Determination of Leukotriene A4 stabilization by S100A8/A9 proteins Using Mass spectrometry. *J.Lipid Res.*

Claesson, H. E., Haeggstrom, J. (1988) Human endothelial cells stimulate leukotriene synthesis and convert granulocyte released leukotriene A<sub>4</sub> into leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> and E<sub>4</sub>. *Eur.J.Biochem.* 173, 93-100

Marleau, S., Fruteau de Laclos, B., Sanchez, A. B., Poubelle, P. E., Borgeat, P. (1999) Role of 5-lipoxygenase products in the local accumulation of neutrophils in dermal inflammation in the rabbit. *J Immunol* 163, 3349-3458

Karmazyn, M. (1996) Role of eicosanoids in the ischemic and reperfused myocardium. In *Myocardial ischemia: mechanisms, reperfusion, protectin* pp. 243-262, 87.

## Figure Legends

### Figure 1. Schematic representation of experimental protocols and treatments. (A)

ApoE<sup>-/-</sup> or apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> mice were treated by s.c. injections of EP 80317 (300 µg/kg) or 0.9% NaCl (vehicle) for 1 (dashed arrow) or 14 days prior to sacrifice. Ischemia was induced by applying a rubber band over the right hind limb for 30 min followed by 3 hours of reperfusion. (B) Mice were injected *i.p* with anti-S100A8/A9 antibodies (1 mg of each/mice) or non specific IgG (2 mg/mice), 16 hours prior to inducing ischemia. (C) Air pouches were raised on the dorsum of CD36<sup>+/+</sup> or CD36<sup>-/-</sup> by injecting 3 ml of sterile air s.c. on days 0 and 3. On day 6, mice received an *i.v* (jugular vein) injection of either anti-CD36 antibodies (50 µg /mice), non specific IgG (50 µg /mice), or EP 80317 (300 µg/kg). One hour later, 1 mL of LPS (1 µg/ml) or its vehicle (0,9% NaCl) was injected into the air pouch (AP). (D) Mice were injected *i.p* with anti-S100A8/A9 antibodies (1 mgof each /mice) or non specific IgG (2 mg/mice), 15 h prior to *i.v* injections.

### Figure 2. Effect of CD36 ligands on PMN accumulation in lungs following hind limb I/R

CD36<sup>+/+</sup> (A) or CD36<sup>-/-</sup> mice (B) fed normal chow (A, left panel), or HFHC diet (A, right panel, B) were treated with EP 80317 (300 µg/kg), EP 30318 (300 µg/kg) or 0.9% NaCl for 2 weeks prior to inducing I/R. PMN accumulation in lung homogenates was estimated by the MPO assay. Results are normalized for total blood leukocyte counts. Data are the mean ± SEM of n= 5-8 mice per treatment. # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01 compared to sham; \* *P* < 0.05 compared to 0.9% NaCl.

**Figure 3. Effect of CD36 ligands on PMN accumulation in remote tissues following hind limb I/R**

CD36<sup>+/+</sup> (A) or CD36<sup>-/-</sup> (B) mice were treated with EP 80317 (300 µg/kg), EP 80318 (300 µg/kg) or 0.9% NaCl for 2 weeks prior to inducing I/R. PMN accumulation in tissue homogenates was estimated by the MPO assay in liver, contralateral (left) gastrocnemius muscle, and intestines (jejunum). #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  compared to sham; \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared to 0.9% NaCl.

**Figure 4. Effect of EP 80317 or neutralizing antibodies anti-S100A8/A9 on PMN priming/activation and accumulation in lungs following hind limb I/R.** CD36<sup>+/+</sup> (A, B) or CD36<sup>-/-</sup> (C, D) mice fed a HFHC diet were treated with EP 80317 (300 µg/kg) or 0.9% NaCl for 2 weeks prior to receiving *i.p* injections of anti-S100A8/A9 antibodies (2 mg) or control IgG (2 mg), 16 hours before inducing ischemia. PMN accumulation in lung homogenates was estimated by MPO assay (A,B). Luminol-enhanced chemiluminescence of activated blood phagocytes was measured in the presence of OpZ and was quantified as the peak amplitude, expressed in %. (C, D). Data are the mean ± SEM of n= 5-6 mice per treatment. \*  $P < 0.05$  compared to 0.9% NaCl.

**Figure 5. Effect of EP 80317 or neutralizing antibodies anti-S100A8/A9 on PMN on LPS-induced leukocyte recruitment in mouse air pouches.** (A) Western blot analysis of protein extracts from dermal microvessels, isolated from air pouches of CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice. Heart membranes of rats and of CD36<sup>-/-</sup> mice were used as positive and negative control, respectively. CD36<sup>+/+</sup> (B) or CD36<sup>-/-</sup> (C) PMN accumulation in air



pouches was determined 4 hours following injection of 1 mL LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) or its vehicle (0.9% NaCl). Total cells and differential counts were obtained. The results are normalized to  $10^6$  PMN/mL blood and presented versus vehicle set as 1. Data are the mean  $\pm$  SEM of  $n = 4-6$  mice per treatment. #  $P < 0.01$  compared with vehicle \*  $P < 0.05$  compared with LPS.

**Figure 6. Hypothetical scheme of events leading to CD36-mediated regulation of PMN accumulation to inflammatory sites.** Activated PMN secrete S100A8/A9 heterodimers associated to AA (or LTA4). The complex binds to CD36 expressed by microvascular endothelial cells (ECs) and AA (or LTA4) is internalized by ECs in order (i) to be metabolized in eicosanoids such as LTB<sub>4</sub>, or (ii) to activate the NADPHox and enhance formation of ROS. CD36 ligands, such as EP 80317 will reduce PMN accumulation to inflammatory sites by preventing endothelial CD36-S100A8/A9 binding and the subsequent inflammatory cascade.

## Figures

**Figure 1**

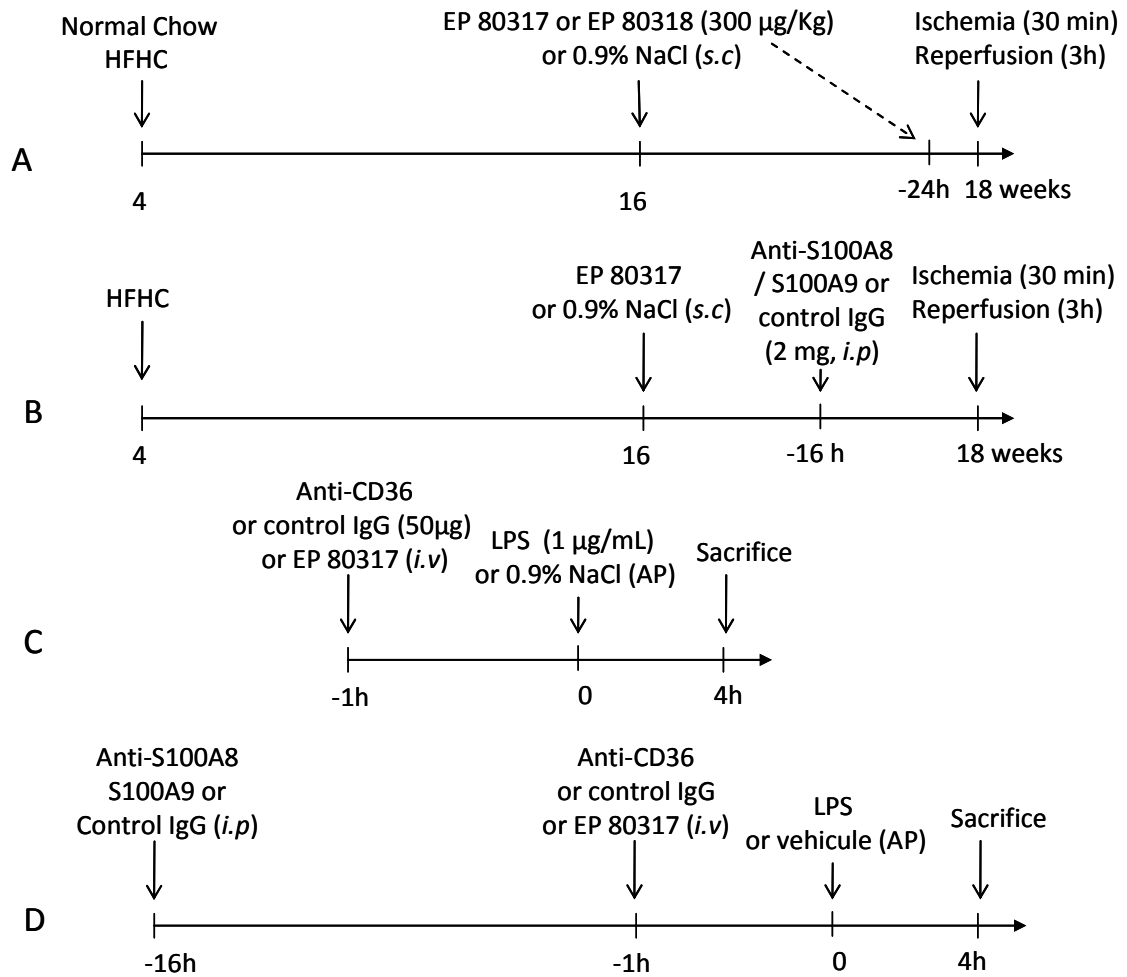


Figure 2

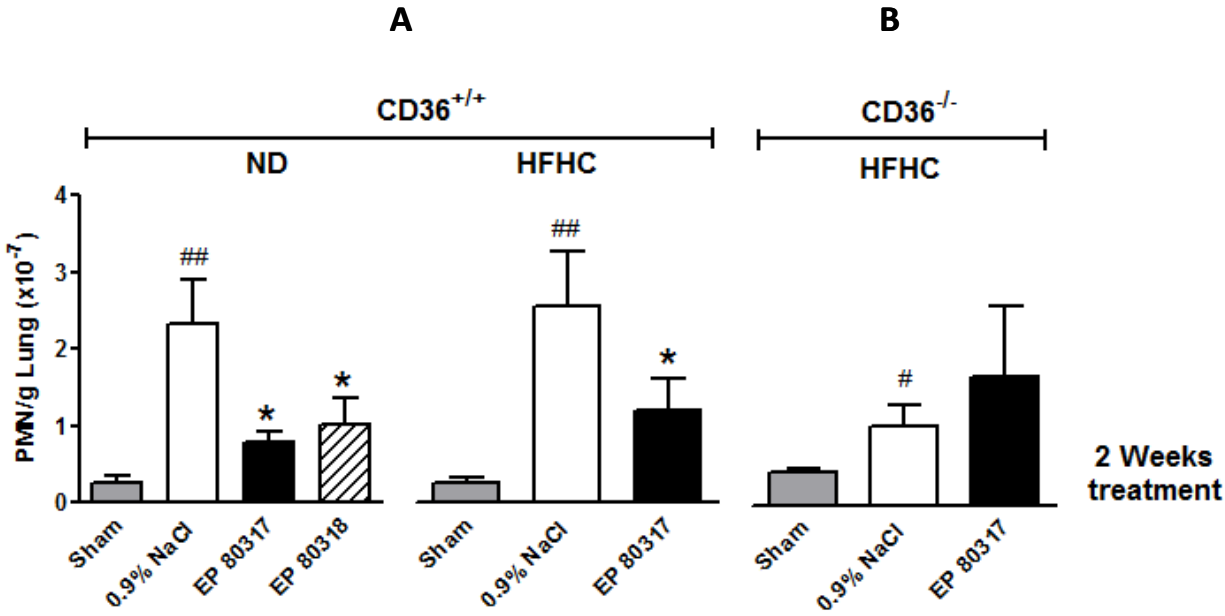


Figure 3

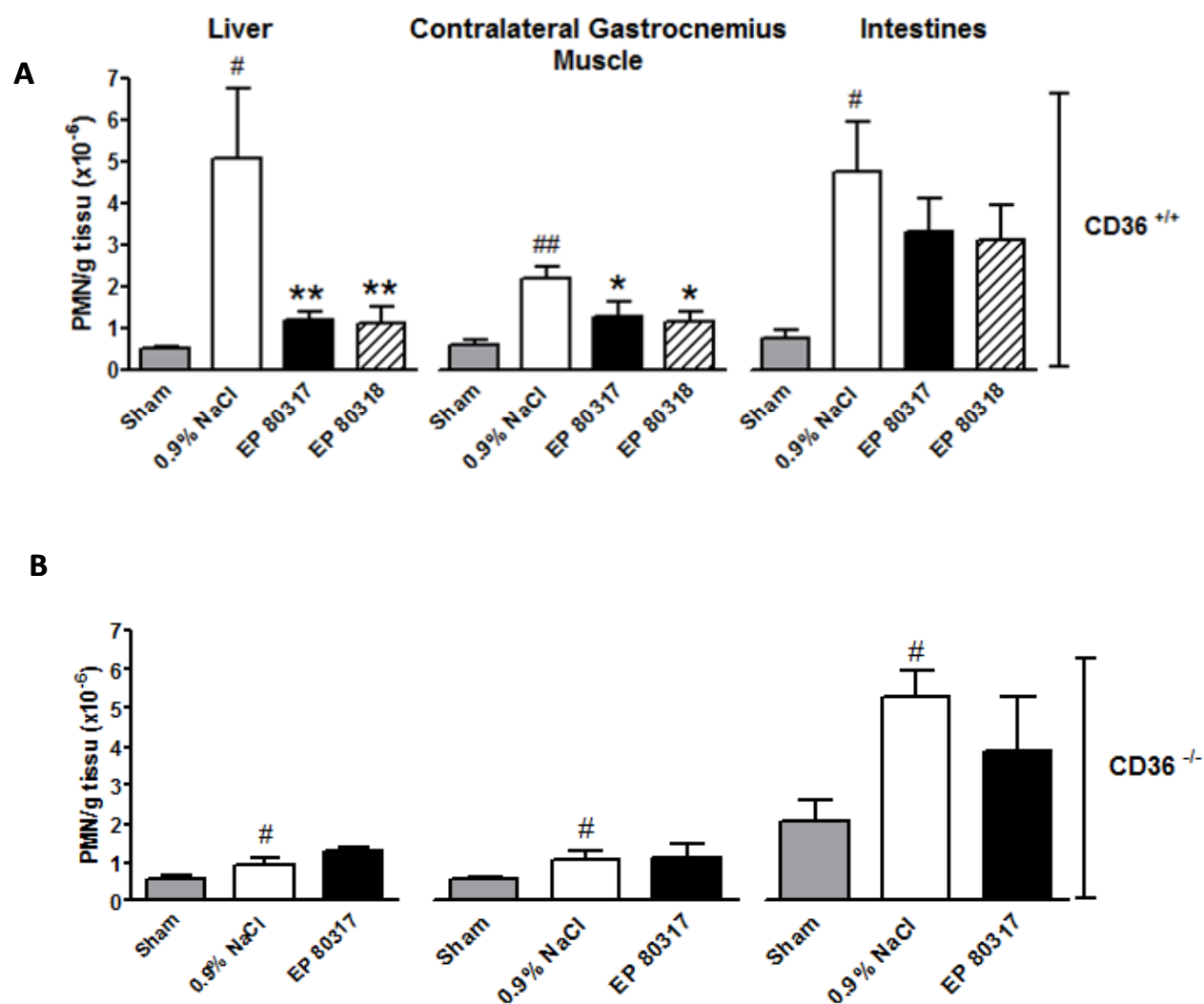


Figure 4

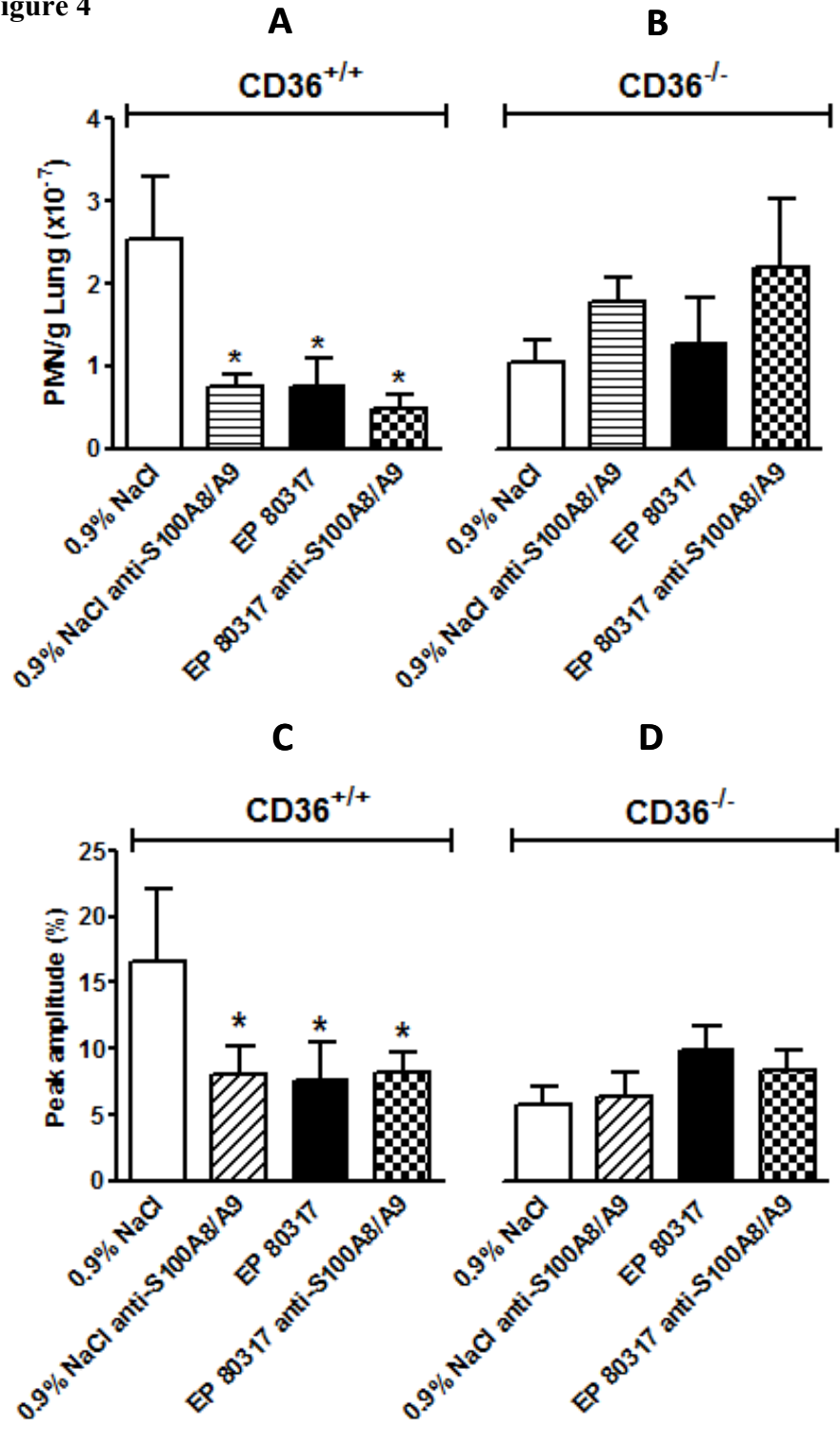


Figure 5

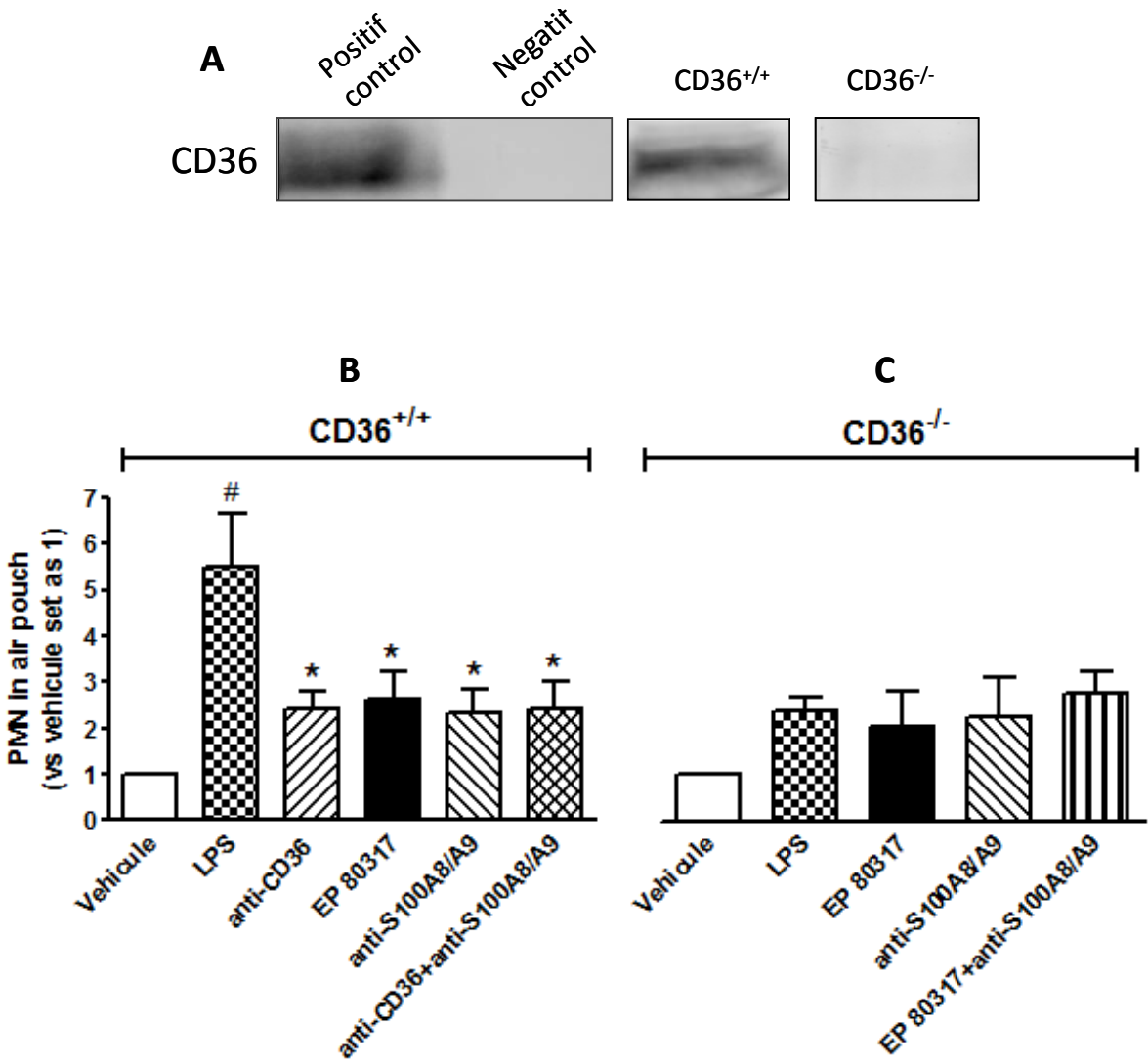
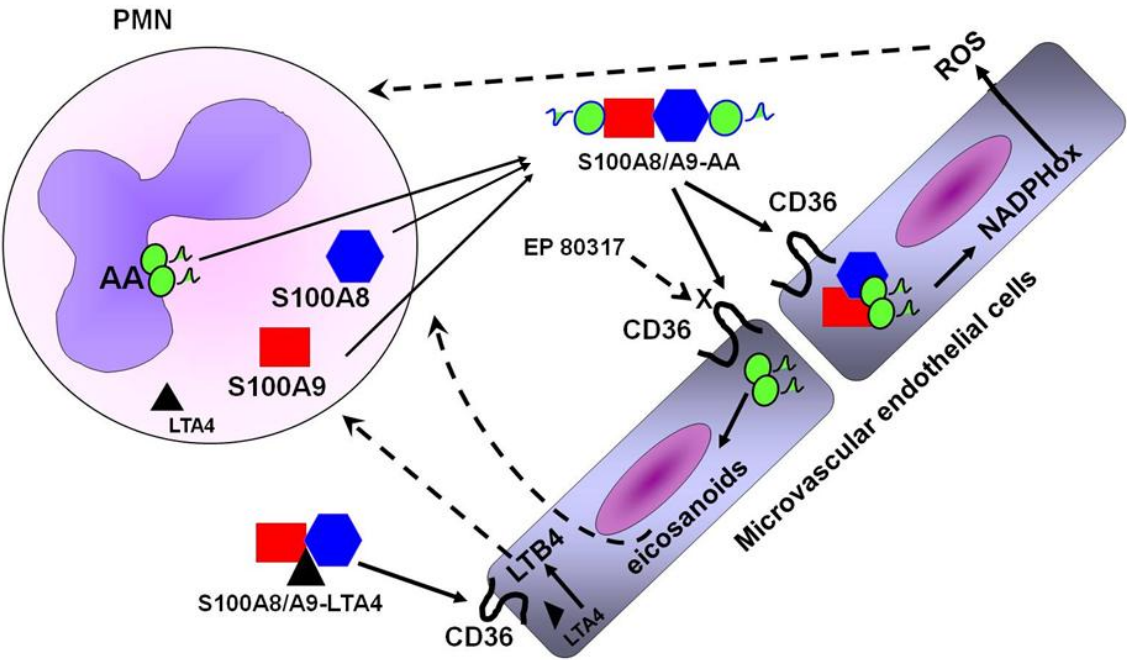


Figure 6



# **Discussion, Conclusions et Perspectives**



L'objectif général de cette thèse était d'élucider le rôle du récepteur CD36 dans différentes conditions pathologiques liées à une réponse inflammatoire chronique (athérosclérose) ou aiguë (ischémie-reperfusion des membres inférieurs). Plus particulièrement, ces travaux visaient l'évaluation des effets de nouveaux ligands du CD36 dans une perspective de nouvelle avenue thérapeutique potentielle pour les pathologies étudiées. La disponibilité d'une lignée de souris transgénique, déficiente en CD36, a permis de valider nos observations. Ces travaux ont permis 1) de caractériser le rôle du CD36 dans la modulation de la composante inflammatoire de l'athérosclérose par des approches génétique et pharmacologique et 2) de décrire pour la première fois l'implication du CD36 dans le recrutement des leucocytes polymorphonucléaires au niveau des sites inflammatoires post-ischémiques.

## **Chapitre 8. Discussion et conclusions**

Les dyslipidémies étant une des causes majeures de l'athérosclérose, les principaux médicaments utilisés à ce jour visent à les corriger (Aikawa and Libby, 2004). Des études épidémiologiques et cliniques indiquent l'existence d'une relation directe et continue entre les taux de cholestérol et le risque cardiovasculaire (Grundy et al., 2004), ce qui explique que les patients sont souvent traités par des doses élevées de statines afin de réduire au maximum leurs taux de LDL (Cannon, 2005). Malheureusement, ces doses élevées peuvent être toxiques et il serait plus bénéfique d'associer d'autres agents anti-athérosclérotiques à des doses modérées de statines (Davidson and Robinson, 2007). De plus, les stratégies actuelles n'apportent pas de solution thérapeutique à l'ensemble des patients. Ainsi, les statines permettent la réduction de près du tiers du nombre

d'accidents cardiovasculaires seulement, ce qui illustre un besoin clinique non comblé (Libby, 2005).

L'étude des différents mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose est donc prioritaire afin de pouvoir proposer de nouvelles approches thérapeutiques. Des médicaments qui auraient la propriété de réduire la formation des cellules spumeuses ou encore l'inflammation au niveau de la paroi vasculaire artérielle pourraient présenter un intérêt thérapeutique substantiel. De ce point de vue, nos travaux visant à caractériser le potentiel thérapeutique d'une nouvelle classe d'agents pharmacologiques ciblant le récepteur CD36 adressent précisément ce manque à combler.

### **8.1. Le récepteur CD36 des monocytes/macrophages: une nouvelle cible thérapeutique dans l'athérosclérose**

Le rôle du CD36 dans l'internalisation des LDLox et dans la formation des cellules spumeuses *in vitro* a été rapporté dès 1993 par Endemann et al (Endemann et al., 1993). En 2000, la docteure Maria Febbraio a montré pour la première fois que la délétion du CD36 protège les souris apoE<sup>-/-</sup> contre le développement des lésions athérosclérotiques (Febbraio et al., 2000). La découverte, en 2002, qu'un hexapeptide de la famille des GHRPs liait le CD36 (Bodart et al., 2002), a été un facteur catalysant la proposition de notre première hypothèse de travail, selon laquelle un ligand du CD36 interférerait avec l'internalisation du LDLox et la formation de lésions athérosclérotiques.

Le premier ligand synthétique du récepteur CD36 testé *in vivo* dans notre laboratoire fut l'hexaréline. L'administration prolongée de l'hexaréline chez les souris apoE<sup>-/-</sup> soumise à une diète HFHC a réduit de 28% le développement des lésions

athérosclérotiques (Avallone et al., 2006). Cependant l'hexaréline n'est pas un ligand sélectif du récepteur CD36, ce peptide liant également le récepteur de la ghréline, le GHS-R1a. Ainsi l'utilisation des ligands sélectifs du CD36 tels que le EP 80317 et le EP 80318 présente l'avantage de mieux discerner la contribution spécifique du récepteur CD36 dans le développement et la progression de l'athérosclérose. Notre première publication rapporte pour la première fois dans la littérature les effets anti-athérosclérotiques d'un ligand sélectif du CD36, le EP 80317. Nos résultats montrent que le traitement préventif des souris apoE<sup>-/-</sup> avec le EP 80317, dès l'âge de 6 semaines jusqu'à leur sacrifice (18 semaines d'âge), a réduit considérablement la surface des lésions athérosclérotiques, de 51% par rapport aux souris traitées avec le véhicule (article I, Figures 1A, 1B). Ces résultats suggèrent qu'au cours du développement de la pathologie, le EP 80317 interfère avec une ou plusieurs étapes clés médiées par le récepteur CD36, limitant ainsi le développement de la pathologie et exerçant des effets anti-athérosclérotiques de nature préventive. Dans une autre série d'expériences, nous avons testé le potentiel curatif du EP 80317 sur la progression des plaques athérosclérotiques. Pour ce faire, le traitement avec le EP 80317 a été débuté quatre, six ou huit semaines après le début de la diète HFHC chez les souris apoE<sup>-/-</sup>. Le EP 80317 a réduit le pourcentage des lésions athérosclérotiques de 39% et 31% après huit et six semaines de traitement, respectivement (article I, Figures 3A, 3B). Ces résultats suggèrent qu'une fois que les lésions athérosclérotiques sont développées, l'instauration d'un traitement avec un ligand sélectif du CD36 offrirait l'avantage de limiter la progression de la pathologie.

Afin de vérifier si l'effet observé est lié à la classe de peptides et non à une particularité unique de la molécule EP 80317, nous avons testé un autre analogue sélectif envers le CD36, le EP 80318 qui présente la même structure que le EP 80317 sauf pour la substitution d'un groupement Haic *[(2S,5S)-5-amino-1,2,4,5,6,7-hexahydro-azepino[3,2,1-hi]indole-4-one-2-carboxylate]* en N-terminal par un groupement Atab *[2-R-(2 $\beta$ ,5 $\beta$ ,8 $\beta$ )-8-amino-7-oxo-4-thia-1-aza-bicyclo[3.4.0]nonan-2-carboxylate]*. Tout comme le EP 80317, ce peptide est dépourvu d'une activité sécrétagogue de l'hormone de croissance dû à la présence d'une lysine en position 3 (Bowers, 1998). Les résultats montrent qu'un traitement prolongé (12 semaines) des souris apoE<sup>-/-</sup> sous diète HFHC avec le EP 80318 a réduit de 30% la surface des lésions athérosclérotiques (Bessi et al., 2007).

Dans le but d'élucider, du moins partiellement, le mécanisme impliqué dans les effets anti-athérosclérotiques des ligands sélectifs du CD36, nous avons vérifié si un traitement par le EP 80317 réduisait les taux plasmatiques du cholestérol. Il est bien reconnu en fait que des taux élevés de cholestérol plasmatiques sont un facteur de risque majeur de l'athérosclérose. Des quantités importantes de lipides peroxydés sont observées au niveau des lésions athérosclérotiques humaines (Podrez et al., 2002a) et il a été établi que ces formes oxydées résultent en majorité des LDL-cholestérol athérogènes (*apoB-containing lipoproteins*) qui infiltrent les parois vasculaires (Libby, 2002; Lusis, 2000). Nos observations montrent qu'un traitement prolongé avec le EP 80317 s'accompagne d'une diminution de 30% des taux plasmatiques du cholestérol total (article I, Figure 1C). Une tendance à l'augmentation des taux plasmatiques de HDL a été observée (article I, Figures 1D, 1E). En accord avec l'observation de l'effet

anti-athérosclérotique, un autre ligand avec une sélectivité de liaison au CD36, le EP 80318, a exercé un effet hypocholestérolémiant chez les souris apoE<sup>-/-</sup> après un traitement prolongé (diminution de 31%, des taux plasmatiques du cholestérol total (Bessi et al., 2007).

Le CD36 lie avec une haute affinité les formes natives des LDL et VLDL (Calvo et al., 1998) et peut médier le captage sélectif des esters de cholestérol à partir du LDL (Connelly et al., 2003). Calvo et al. (1998) ont suggéré que le CD36 pourrait réguler le métabolisme lipidique (Calvo et al., 1998). Récemment Luangrath et al (2008) ont montré que les hépatocytes murins expriment le CD36 de façon appréciable et que le CD36 joue un rôle dans la retardation de la clairance hépatique du LDL et du LDL minimalement oxydé (LDLmox) (Luangrath et al., 2008). Les auteurs ont suggéré qu'en liant le LDL au niveau hépatique, le CD36 rend ces lipoprotéines moins disponibles pour se lier au récepteur hépatique au LDL (LDL-R), ce qui réduit leur dégradation et augmente leurs taux plasmatiques (Luangrath et al., 2008). Il est ainsi possible qu'en liant le CD36 exprimé par les hépatocytes, les GHRPs limitent la liaison du récepteur aux LDL et au LDLmox retrouvés en circulation, rendant ces derniers plus disponibles pour le LDL-R et favorisant leur captage hépatique et leur clairance. Comme au niveau des macrophages (article I, Figure 5), il est également possible que les ligands sélectifs du CD36 activent les récepteurs PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$  au niveau hépatique et intestinal régulant ainsi le métabolisme du cholestérol (Chawla et al., 2001, Beaven et al., 2006). En effet, l'activation de PPAR $\gamma$  au niveau du foie réduit la synthèse du cholestérol par inhibition du facteur de transcription SREBP-2 (*sterol response element binding protein-2*) qui régule l'expression de la *HMG-CoA reductase* (Klopotek et al., 2006), et l'activation de

LXR $\alpha$  augmente l'expression hépatique et intestinale des transporteurs ABCG5 et ABCG8, ce qui augmente la sécrétion biliaire du cholestérol (Li et al., 2009) et réduit l'absorption intestinale du cholestérol par augmentation de l'efflux des stérols jusqu'à la lumière intestinale (Levy et al., 2007). Ces mécanismes d'action restent à être vérifiés.

Les effets anti-athérosclérotiques des GHRPs ne peuvent pas tous être expliqués par les effets hypocholestérolémiants des peptides. En effet, de courtes périodes de traitement (4 semaines) s'accompagnent par d'importants effets anti-athérosclérotiques (~30% de réduction des lésions athérosclérotiques) bien qu'aucun effet hypocholestérolémiant n'est observé (article I, Figure 3). Il est ainsi évident que des mécanismes d'action autres que ceux liés au métabolisme lipidique sont associés aux effets thérapeutiques des GHRPs. Ainsi, nous avons vérifié si le EP 80317 modulait l'homéostasie du cholestérol cellulaire. En premier lieu, nous avons étudié l'effet d'un traitement par le EP 80317 sur l'internalisation des LDLox par le CD36. En fait, les GHRPs compétitionnent avec le LDLox pour se lier au récepteur CD36 (Demers et al., 2004). Récemment, Podrez et al. ont identifié les résidus lysines 164 et 166 du CD36 comme étant des sites cruciaux pour la liaison et l'internalisation des PCox<sub>CD36</sub> par le CD36 (Kar et al., 2008). Étant donné que les GHRPs se lient à un site qui chevauche avec le domaine 132-169 (Demers et al., 2004), il est fort possible que la diminution de la formation des cellules spumeuses résulte d'une compétition de liaison au niveau du CD36. Nous avons isolé des macrophages péritonéaux de souris apoE<sup>-/-</sup> et apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup> traitées ou non par le EP 80317 pendant une période prolongée de 12 semaines. Nos résultats montrent qu'un prétraitement avec le EP 80317 a réduit de 21% l'internalisation du LDLox dans les macrophages (article I, Figure 5A). Notons que les macrophages péritonéaux n'ont pas

été traités *ex vivo* par le EP 80317 pendant la période d'incubation avec le LDLox, excluant la conclusion que la diminution de l'internalisation du LDLox par les macrophages est liée exclusivement à un effet de compétition. Il est ainsi possible que les GHRPs, en plus de compétitionner avec le LDLox pour sa liaison au CD36, interfèrent avec les voies de signalisation associées au CD36 et impliquées dans l'internalisation du LDLox. En effet, le groupe des Drs Febbraio et Silverstein a montré que pour être internalisé et pour amener à la formation des cellules spumeuses, le LDLox active au niveau des macrophages une voie de signalisation dépendante du CD36 impliquant la kinase Src *lyn*, MEKK2 et JNK2, et que l'interaction CD36-Src est une étape limitante dans la formation des cellules spumeuses (Rahaman et al., 2006). Récemment, la phosphorylation du facteur Vav1 (*guanine nucleotide exchange factor*) de façon dépendante du CD36 a été décrite dans la régulation de l'internalisation du LDLox (Rahaman et al., 2011), et il a été suggéré que l'activation des protéines Vav pourrait moduler la formation des cellules spumeuses par régulation de la maturation des vésicules endocytosoliques internalisant le LDLox en aval du CD36 (Rahaman et al., 2011). Stewart et al. (2010) ont récemment montré que le traitement des cellules avec du LDLox induit la formation du complexe CD36/TLR4/TLR6 suite à l'activation des kinases Src recrutées au niveau de la partie C-terminale du récepteur (Stewart et al., 2010). Cette hétérotrimérisation est suivie par l'internalisation des récepteurs CD36 et TLR4 jusqu'aux compartiments intracellulaires à travers un mécanisme dépendant de la dynamine (Stewart et al., 2010). De façon intéressante, l'utilisation d'un inhibiteur de la dynamine inhibe également l'internalisation du LDLox (Stewart et al., 2010), une observation en accord avec des données rapportées en 2007 par Sun et al., impliquant la

queue cytoplasmique C-terminale du récepteur CD36 dans l'internalisation du LDLox par un mécanisme dépend de la dynamine au niveau des macrophages (Sun et al., 2007). Afin de pouvoir expliquer les mécanismes par lesquels le EP 80317 diminue l'internalisation du LDLox au niveau des macrophages autre que par le mécanisme de compétition, il s'avère ainsi important de vérifier l'effet d'un prétraitement des monocytes/macrophages avec le EP 80317 sur l'activation des kinases Src et des différentes voies de signalisation impliquées dans l'endocytose du LDLox (Sun et al., 2007; Stewart et al., 2010) et dans la formation des cellules spumeuses (Rahaman et al., 2006; Rahaman et al., 2011).

L'efflux du cholestérol à partir des macrophages tissulaires est largement régulé par la voie PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -transporteurs ABC et contrôle fortement la formation des cellules spumeuses (Ricote et al, 2004; Choudhury et al., 2005). Nous avons montré que le EP 80317 augmente l'expression génique et protéique de LXR $\alpha$  ainsi que celles des deux transporteurs membranaires ABCG1 et ABCA1 au niveau des macrophages (article I, Figures 5B, 5C). Les mécanismes à l'origine de l'activation de cette voie ont été récemment élucidés par Bujold et al (2009). En effet, le EP 80317 stimule l'activation de ERK1/2 puis celle de la cyclooxygénase-2 (COX-2), conduisant à la production d'un puissant ligand endogène de PPAR $\gamma$ , le 15d-PGJ2 et à l'activation subséquente de LXR $\alpha$  (Bujold et al., 2009). L'activation de la voie PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -transporteurs ABC par les GHRPs s'accompagne par une augmentation de l'efflux du cholestérol à partir des macrophages (Bujold et al., 2009; Avallone et al., 2006) amenant possiblement à une réduction de la formation des cellules spumeuses *in vivo*.



Les résultats de notre première publication appuient le développement des ligands synthétiques du CD36 pour une utilisation clinique. Plusieurs cibles thérapeutiques sont poursuivies actuellement par les industries pharmaceutiques, dont les agonistes des récepteurs nucléaires. Le EP 80317 présente l'avantage, par rapport à certaines de ces molécules telles que les agonistes de LXR $\alpha$  ou de PPAR $\gamma$ , de réduire le développement de l'athérosclérose sans moduler négativement certains paramètres lipidiques plasmatiques (Article I, Figure 1D) ou l'expression des récepteurs éboueurs pro-athérosclérotiques au niveau des macrophages (Article I, Figure 5C). En effet, alors que les agonistes des récepteurs LXR $\alpha$  sont associés à une hypertriglycéridémie hépatique et plasmatique (Fiévet and Staels, 2009), le traitement avec le EP 80317 (Article I, Figure 1D) offre l'avantage de ne pas causer une augmentation des niveaux plasmatiques des triglycérides ni d'induire une stéatose hépatique. En effet, la majorité des ligands de LXR disponibles sont des doubles agonistes qui activent les deux isoformes LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  (Fiévet and Staels, 2009). Bien que ces agonistes présentent des effets favorables sur le métabolisme du cholestérol (Naik et al., 2006) et sur le développement de l'athérosclérose (Joseph et al., 2002; Terasaka et al., 2003), l'activation de LXR $\alpha$  au niveau hépatique pourrait s'accompagner par des effets indésirables sur le métabolisme des acides gras et l'induction d'une stéatose hépatique, ce qui limite le développement clinique de ces molécules. Ainsi, l'activation de LXR $\alpha$  par des molécules synthétiques tel que le T0901317 induit une augmentation de l'expression des gènes hépatiques impliqués dans la synthèse des acides gras (SREBP1c, FAS, ACC, SCD1, ChREBP) et réduit l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des triglycérides (Angptl1, apoA-V) (Fiévet and Staels, 2009). De plus, les agonistes des PPAR $\gamma$  dont les

thiazolidinediones utilisées en clinique pour le traitement de la résistance à l'insuline et du diabète présentent l'inconvénient d'induire une augmentation de l'expression du récepteur CD36, ce qui engendre une boucle d'activation positive entre PPAR $\gamma$  et CD36 et favorise l'accumulation lipidique dans les macrophages (Benton et al., 2008; Nicholson, 2004). À l'opposé, le traitement avec le EP 80317 offre l'avantage d'activer PPAR $\gamma$  (Bujold et al., 2009) et de stimuler au niveau du macrophage l'expression de certaines protéines bénéfiques (tel que LXR $\alpha$ , ABCA1, ABCG1) sans induire une augmentation significative de l'expression protéique du CD36 (article I, Figure 5C). Le mécanisme de cette activation sélective des gènes par le EP 80317 n'est pas encore clairement établi. Signalons que les essais d'immunoprécipitation de la chromatine montrent que le traitement des cellules monocytiques humaines THP-1 avec l'hexaréline stimule l'occupation préférentielle par PPAR $\gamma$  du promoteur de LXR $\alpha$  par opposition au promoteur du CD36 (Avallone et al., 2006). Notons également que le gène CD36 possède trois promoteurs (Sato et al., 2007) dont un est l'élément de réponse atypique (PPRE) qui répond à l'activation de PPAR $\gamma$  au niveau des macrophages (Sato et al., 2002; Tontonoz et al., 1998). Le récepteur CD36 peut être exprimé à partir de cinq premiers exons alternatifs (Rac et al., 2007) et l'expression à partir de ces exons semble être régulée différemment au niveau des divers tissus, indiquant une activation possiblement différentielle des promoteurs selon les tissus (Andersen et al., 2006). Notons également que le statut de phosphorylation de certains récepteurs nucléaires peut restreindre le répertoire d'expression de gènes cibles par un recrutement différentiel de cofacteurs (Faus and Haendler 2006; Torra et al. 2008). Il est ainsi possible que la phosphorylation de PPAR $\gamma$  après un traitement avec le EP 80317 active un recrutement

différentiel de cofacteurs qui induisent un effet restrictif sur l'expression de certains gènes cibles, dont le CD36.

Une caractéristique des GHRPs est que leur site de liaison au CD36 ne chevauche pas avec celui de la TSP-1 (Demers et al., 2004). Ceci élimine une possibilité d'interférence des GHRPs avec les voies anti-angiogéniques activées par les protéines à séquence «*thrombospondin repeat*» (TSR) en aval du CD36, surtout que certaines de ces molécules sont testées actuellement dans le traitement du cancer (Jimenez et al., 2000; Primo et al. 2005).

Une observation importante de nos travaux est la démonstration d'un effet thérapeutique du EP 80317 dépendant du CD36. En effet, la disponibilité de souris apoE<sup>-/-</sup> CD36<sup>-/-</sup> nourries avec une diète HFHC, nous ont permis de montrer que l'absence du récepteur CD36 confère aux souris une importante protection contre le développement de l'athérosclérose, avec une réduction de l'ordre de 80% des lésions athérosclérotiques par comparaison aux souris apoE<sup>-/-</sup> (article I, Figure 2A). De plus, ces souris ne répondent pas au traitement par le EP 80317 et ne montrent aucun effet anti-athérosclérotique ou hypocholestérolémiant (article I, Figure 2). Ces résultats appuient davantage l'implication du CD36 dans l'athérosclérose, montrent l'importance de cibler le CD36 comme nouvelle avenue thérapeutique et confirment *in vivo* les résultats de Dre Febbraio concernant le rôle critique du CD36 dans le développement de l'athérosclérose.

En conclusion, notre première étude nous a permis de décrire les effets anti-athérosclérotiques du EP 80317, un ligand sélectif du CD36, et d'élucider certains de ses mécanismes d'action. Ces résultats nous ont conduit à étudier davantage le rôle du

CD36 dans le processus pathologique de l'athérosclérose et à explorer de nouveaux mécanismes d'action des GHRPs.

## **8.2. Le rôle du CD36 dans le recrutement des phagocytes mononucléés au niveau des lésions athérosclérotiques**

La migration des leucocytes au foyer inflammatoire est un processus dynamique comportant un certain nombre d'étapes intégrant plusieurs voies de signalisation dirigées vers un changement dynamique du cytosquelette cellulaire (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004 ; Worthylake and Burridge, 2001). Parmi les voies de signalisation essentielles à la migration des monocytes, notons celle de l'activation de la kinase Pyk2 des podosomes (Mitra et al., 2005; Okigaki et al., 2003). Les phospholipides oxydés tels que les PCox<sub>CD36</sub> sont retrouvés à des niveaux élevés au niveau des lésions athérosclérotiques des modèles animaux (Podrez et al., 2002a) et de l'homme (Silverstein et al., 2010). Ils sont également détectés au niveau de la circulation sanguine des souris athérosclérotiques apoE<sup>-/-</sup> et des sujets hyperlipidémiques athérosclérotiques (Podrez et al., 2007). Ces PCox<sub>CD36</sub> sont actifs biologiquement du fait que leur liaison au CD36 déclenche une voie de signalisation dépendante du CD36 impliquant Src/MAPKK/JNK2 au niveau des macrophages et entraîne la formation des cellules spumeuses (Rahaman et al., 2006). Même à l'état de traces, les PCox<sub>CD36</sub> sont fortement reconnus par les macrophages de manière dépendante du CD36 (Podrez et al., 2002b). Notons que les protéoglycanes (PGs), entre autres les PG qui présentent des chaînes de sulfate d'héparane exprimées au niveau de la surface des cellules endothéliales peuvent interagir avec le LDL en circulation (Jackson

et al., 1991) et lier le LDLox (Makoveichuk et al., 1998; Auerbach et al., 1996). Il est ainsi possible que les PCox<sub>CD36</sub> retrouvés en circulation des sujets athérosclérotiques se trouvent liés aux PGs de surface des cellules endothéliales et soient présentés aux monocytes marginés. Les monocytes les reconnaissent possiblement via le CD36 ce qui déclencherait une signalisation cellulaire et activerait la migration haptotaxique de ces cellules vers l'espace sous-endothélial. Comparé à une chimiokine soluble, un agent chimiotactique immobilisé au niveau de la surface apicale des cellules endothéliales pourrait stimuler non seulement l'activation des leucocytes (Luster et al., 2005) mais également a) le roulement des cellules, b) l'induction d'une adhésion ferme et c) la transmigration cellulaire (Rot and von Andrian, 2004). Il est ainsi possible que la reconnaissance via le CD36 des PCox<sub>CD36</sub> exprimés au niveau des cellules endothéliales favorise ces différentes étapes. Nos études se sont attardées à vérifier la signalisation cellulaire associée à l'étalement des cellules et l'activation de leur transmigration. Pyk2, aussi connue sous le nom de *related adhesion focal tyrosine kinase* ou *cell adhesion kinase  $\beta$* , est une tyrosine kinase cytoplasmique dont l'activation initie sa translocation au niveau des podosomes (Duong and Rodan, 2000). Les phagocytes mononucléés déficients en Pyk2 (Pyk2<sup>-/-</sup>) n'arrivent pas à se polariser et à migrer en réponse à un stimulus chimiotactique *in vitro* (Okigaki et al., 2003). De plus, les cellules Pyk2<sup>-/-</sup> ne migrent pas efficacement au niveau des sites inflammatoires *in vivo* (Okigaki et al., 2003). Étant donné l'importance de Pyk2 dans la motilité et la migration des phagocytes mononucléés, nous avons vérifié l'hypothèse que le récepteur CD36 exprimé par les monocytes/macrophages répond à ses ligands endogènes, tels que les PCox<sub>CD36</sub>, pour activer la kinase Pyk2 et favoriser la transmigration des leucocytes à travers

l'endothélium. Nos résultats montrent que le POVPC augmente de 2.4 fois la phosphorylation de Pyk2 chez les cellules macrophagiques RAW 264.7 (article II, Figure 2A) de même que chez les macrophages péritonéaux (Figure 1S) par rapport aux cellules traitées par le véhicule. De plus, l'augmentation de la phosphorylation de Pyk2 induite par le POVPC dépend de l'expression du CD36 au niveau des macrophages. En effet, les macrophages péritonéaux isolés de souris CD36<sup>-/-</sup> ne montrent pas d'augmentation de la phosphorylation de Pyk2 en présence de POVPC (article II, Figure 5B). De plus, l'utilisation d'un anticorps polyclonal anti-CD36 dirigé contre les résidus 164-182 du CD36 de rat réduit la phosphorylation de Pyk2 de 38 % (article II, Figure 3A). Notons que le site de liaison de l'anti-CD36 chevauche le site de liaison du POVPC (résidus 160-168) (Kar et al., 2008) et du LDLox (résidus 164-183) (Rac et al., 2007) au niveau du domaine extracellulaire du récepteur CD36.

Un point commun précoce dans les voies de signalisation du CD36 est l'activation des kinases Src (Huang et al., 1991; Stuart et al., 2007; Collot-Teixiera et al., 2007; Febbraio and Silverstein, 2007). Nos résultats montrent que l'activation de Pyk2 chez les macrophages en réponse au POVPC implique les kinases Src considérant le fait que l'inhibition de ces dernières s'accompagne par l'absence de phosphorylation de Pyk2 (article II, Figure 3B). Cette observation appuie le rôle de Src dans la signalisation du CD36 conduisant à l'activation de Pyk2 au niveau des phagocytes mononucléés. Nous nous sommes alors demandé si l'activation de Pyk2, résultant de la signalisation du récepteur CD36, se traduisait par une augmentation de la migration des monocytes sanguins vers les lésions athérosclérotiques. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mis au point un modèle utilisant des macrophages radiomarqués à l'indium 111 nous

permettant de suivre l'accumulation de ces cellules au niveau de lésions athérosclérotiques préexistantes chez les souris recevant ces cellules. En dépit des limites inhérentes à cette expérimentation, incluant le fait que les cellules utilisées étaient différenciées en macrophages, nos résultats ont permis de démontrer une accumulation différentielle des cellules provenant de souris donneuses  $CD36^{+/+}$  et  $CD36^{-/-}$  au niveau des lésions athérosclérotiques. Ainsi, les macrophages-In<sup>111</sup> déficients en  $CD36$  montrent une accumulation au niveau des lésions athérosclérotiques beaucoup plus limitée que les macrophages-In<sup>111</sup> exprimant le récepteur  $CD36$  (article II, Figures 1A et 5A). Cette différence dans l'accumulation des phagocytes mononucléés au niveau des plaques athérosclérotiques ne peut pas être attribuée à un phénotype différent des souris receveuses, dérivant de la même famille et soumises au même protocole expérimental, mais vraisemblablement au phénotype différentiel des phagocytes radiomarqués quant à l'expression ou à l'absence du récepteur  $CD36$ . En effet, les deux groupes de souris receveuses sont comparables à tous les niveaux : âge, diète (HFHC), poids, pourcentage de lésions, niveaux plasmatiques du cholestérol total, inflammation systémique, et même voie d'injection des cellules radiomarquées (veine jugulaire). Les exsudats péritonéaux utilisés ont été recueillis de la même manière, à partir de souris donneuses non stimulées, ayant le même âge et nourries avec la même diète (diète normale), et le radiomarquage a été effectué le même jour en suivant le même protocole expérimental et en utilisant le même lot d'In<sup>111</sup>. Également, les souris donneuses utilisées présentaient le même fond génétique: les souris  $apoE^{-/-}/CD36^{-/-}$  (donneuses de cellules  $CD36^{-/-}$ ) et leurs propres souris contrôles  $apoE^{-/-}$  (donneuses de cellules  $CD36^{+/+}$ ) ont été croisées six fois sur un fond C57BL/6. L'examen des images

radiographiques montre une accumulation des macrophages-In<sup>111</sup> CD36<sup>+/+</sup> préférentielle au niveau des lésions athérosclérotiques par comparaison aux zones vasculaires exemptes de lésions athérosclérotiques. Ainsi, les cellules exprimant le CD36 semblent reconnaître un ligand endogène athérogénique, tels que les PC<sub>OXCD36</sub>, au niveau des plaques athérosclérotiques, possiblement présenté à la surface endothéliale des monocytes marginés, activant ainsi la migration des cellules vers les sites inflammatoires athérosclérotiques. Notre conclusion est appuyée par la littérature, dont cette étude qui montre que la transplantation de cellules souches provenant de souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> protège les souris transplantées contre le développement de l'athérosclérose (Febbraio et al., 2004). En résumé, nos résultats montrent pour la première fois que le récepteur CD36 n'est pas simplement un récepteur éboueur qui internalise le LDLox, mais qu'il est également un récepteur qui régule *in vivo* la migration des cellules qui l'expriment au niveau des plaques athérosclérotiques.

La migration cellulaire est un processus qui consiste en l'extension des lamellipodes suite à la formation des podosomes, à la polymérisation des filaments d'actine et à la rétraction de l'uropode (Nourshargh et al., 2010). Un équilibre entre l'assemblage et le désassemblage du cytosquelette doit être maintenu afin d'assurer le mouvement et la migration cellulaire (Park et al., 2009; Okigaki et al., 2003). En lien avec nos observations, Park et al. ont montré que chez les macrophages péritonéaux induits par le thioglycolate, le LDLox active la génération de ROS intracellulaires qui inhibent la tyrosine phosphatase SHP-2 (*Src homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase*) par une oxydation des résidus cystéine à son site catalytique, entraînant l'activation soutenue de FAK (Park et al., 2009). Park et al. (2009) ont suggéré que cette voie de



signalisation induit l'étalement des macrophages et les ancrent sur place, inhibant leur migration tissulaire. Nos données et celles de Park sont complémentaires puisque l'activation transitoire de Pyk2 chez les monocytes active la migration cellulaire alors qu'une activation soutenue de FAK chez les macrophages inhibe leur migration en dehors de l'espace sous-intimal (Silverstein et al., 2010; Schaller, 2010). En accord avec cet énoncé, le POVPC entraîne une phosphorylation transitoire de Pyk2 qui est maximale à 30 minutes dans les cellules RAW264.7 (article II, Figure 2A) et à 10 minutes dans les macrophages péritonéaux résidents (Figure 1S). Par contre, la phosphorylation de FAK dans les macrophages péritonéaux induits par le thioglycolate reste maximale même 2 heures après la stimulation par le LDLox (Park et al., 2009). Ces différences de cinétique de phosphorylation sont possiblement liées à l'utilisation de macrophages péritonéaux inflammatoires induits par le thioglycolate par Park et al. et des macrophages péritonéaux résidents non stimulés par notre laboratoire. Nos données et celles de Park et al. peuvent s'expliquer ainsi:

Les monocytes marginés à la surface endothéliale reconnaissent le LDLox lié aux protéoglycanes de la surface des cellules endothéliales (Makoveichuk et al., 1998; Jackson et al., 1991). La reconnaissance des PCox<sub>CD36</sub> par le CD36 stimule Pyk2 de façon transitoire (Harb et al., 2009) activant ainsi la migration cellulaire et le passage des monocytes dans l'espace sous-endothélial. A ce niveau, les monocytes se différencient en macrophages, ce qui induit l'expression de FAK dans les cellules différenciées (Kharbanda et al., 1995; Kume et al., 1997; Rovida et al., 2005). Les macrophages de l'espace sous-endothélial participent activement à la liaison et à l'internalisation du LDLox, principalement via le CD36 (Silverstein and Febbraio.,

2000). Cette fonction s'associe à la génération immédiate de ROS intracellulaires (Kuchibhotla et al., 2008, Park et al., 2009) ce qui inhibe rapidement SHP-2 et active FAK de manière soutenue (Park et al., 2009). L'activation soutenue de FAK inhibe la migration des macrophages hors des lésions athérosclérotiques [inhibition de leur sortie à travers la circulation lymphatique (Llodra et al., 2004)] et les emprisonne au niveau vasculaire, limitant la régression des plaques et provoquant la progression des lésions.

En 1987, Quinn et al. ont montré, dans un modèle modifié de la chambre de Boyden, que le LDLox exerce un effet chimiotactique sur les monocytes humains et stimule leur migration, alors que le LDLox exerce un effet chimiostatique sur les macrophages péritonéaux et inhibe leur migration. Donc, des observations similaires à celles de notre groupe (LDLox stimule la migration des phagocytes mononucléés) et à celles du Dre Febbraio (LDLox inhibe la migration des macrophages) ont été décrites par Quinn et al. 23 ans plus tôt. Le groupe mentionne dans sa publication que bien que leur étude permet d'établir clairement que le LDLox est chimiotactique pour les monocytes sanguins *in vitro*, la preuve *in vivo* du rôle du LDLox dans le recrutement et la rétention des monocytes dans les vaisseaux artériels reste à être démontrée (Quinn et al., 1987). Ce n'est donc que 23 ans plus tard que nous décrivons un nouveau mécanisme pouvant expliquer, du moins en partie, les anciennes observations de Quinn et al., par la démonstration d'un effet chimiotactique du LDLox, dépendant du CD36.

Notons que nos études ne permettent pas de discerner entre un rôle direct du récepteur CD36 dans la régulation de la migration des monocytes au niveau vasculaire, ou une signalisation croisée potentielle de ce dernier avec d'autres récepteurs membranaires tels que les intégrines  $\beta 1$  (Thorne et al., 2000; Bamberger et al., 2003),  $\beta 3$

(Stern et al., 1996), SR-A (Wilkinson et al., 2006) ou encore le TLR2 (Hoebe et al., 2005; Stuart et al., 2005). Signalons cependant qu'au niveau des plaquettes, l'activation des voies dépendantes du CD36 a lieu indépendamment de l'activation des intégrines (Chen et al., 2008) tandis qu'au niveau des monocytes/macrophages, le LDLox et les PCox<sub>CD36</sub> induisent une signalisation indépendante du TLR-2 et du SR-A, mais dépendante de l'extrémité cytoplasmique C-terminale du CD36 qui induit le recrutement des kinases Src (Rahaman et al., 2006). Très récemment, le groupe de Moore a montré que dans les cellules HEK293 surexprimant le CD36, la liaison du LDLox au CD36 active en premier la kinase Lyn qui interagit avec le CD36 au niveau de la tyrosine 463, ce qui induit l'hétérodimérisation subséquente de TLR4/TLR6 (Stewart et al., 2010). Il serait ainsi important de vérifier dans des études à venir si le CD36 agit seul ou s'il coopère avec d'autres récepteurs pour activer la migration des monocytes vers les plaques athérosclérotiques en réponse aux lipides oxydés.

Comme le recrutement des monocytes au niveau vasculaire s'accompagne par le déclenchement et l'intensification d'une réponse inflammatoire et d'un stress oxydatif important (Saha et al., 2009; Bobryshev, 2006; Stocker and Keaney, 2004), nous avons étudié les paramètres inflammatoires vasculaires. Les cytokines pro-inflammatoires produites au niveau vasculaire orchestrent la production des molécules d'adhérence, des métalloprotéinases, de ROS et d'autres cytokines qui peuvent jouer un rôle local et systémique (Libby, 2002). En particulier l'IL-6, au niveau hépatique, stimule la réponse inflammatoire de la phase aiguë conduisant à la synthèse de cytokines, de fibrinogène et du PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) par les hépatocytes (Packard and Libby, 2008). Nos résultats ont montré que les souris déficientes en CD36 (apoE<sup>-/-</sup>/CD36<sup>-/-</sup>)

montrent un niveau basal d'IL-6 inférieur de 45% ( $P < 0.001$ ; article II Figure 6) par comparaison aux souris exprimant le récepteur. Nos résultats sont en accord avec les données du groupe de Febbraio qui montrent que la déficience en CD36 s'accompagne par une réduction des niveaux plasmatiques de cytokines et chimiokines, telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-4, le MIP-3 $\alpha$ , l'INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  (Kuchibhotla et al., 2008). Nos observations, selon lesquelles l'activation de la voie de signalisation Src/Pyk2 est activée en réponse aux PCox<sub>CD36</sub> pourrait expliquer, du moins en partie, le rôle potentiel du CD36 dans la réponse inflammatoire. En effet, les kinases Src et Pyk2 sont intimement associées à la réponse inflammatoire par l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires au niveau des monocytes/macrophages telles que MyD88 (Xi et al., 2010), p130 Cas (Cornillon et al., 2003), JNK2 (Rahman et al., 2006; Ip and Davis, 1998) et p44/42 MAPK (Stuart et al., 2007). Au niveau vasculaire, un traitement chronique avec le EP 80317 s'accompagne par une réduction de l'inflammation, tel que démontré par une réduction de l'expression de VCAM-1, CCL2 et du stress oxydatif, avec une diminution de l'expression de iNOS et de gp91phox au niveau de l'aorte des souris apoE<sup>-/-</sup> (article II, Figure 4), ainsi que de l'inflammation systémique (article II, Figure 6). Ces effets anti-inflammatoires peuvent résulter en partie de la réduction de l'accumulation des monocytes/macrophages au niveau vasculaire ainsi que de l'effet hypocholestérolémiant du peptide (Stocker and Keaney, 2004; Fan and Watanabe, 2003). Il est également possible que ces effets soient dus à un effet du EP 80317 sur la réduction de l'activation de Pyk2 et des voies de signalisation associées, telles que le MyD88 (Xi et al., 2010), la voie Ras/cRaf/MEK1/2 (Stuart et al., 2007) et JNK (Rahaman et al., 2008}. L'activation des récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  et LXR $\alpha$  (article

I, Figure 5; Bujold et al., 2009) pourrait également être associée à une réponse anti-inflammatoire due à la transrépression des facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que NF- $\kappa$ B, AP1, STAT, et l'inhibition subséquente de l'expression des gènes pro-inflammatoires dont VCAM-1, MMP9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et iNOS (Hong and Tontonoz, 2008; Bouhrel et al., 2008; Bouhrel et al., 2007; Ricote et al., 1998). Stewart et al. ont de plus montré que le LDLox active la formation de l'hétérotrimère CD36/TLR4/TLR6 et la propagation d'une réponse inflammatoire médiée par les protéines adaptatrices MyD88 et TRIF en aval de TLR4/TLR6, avec l'activation subséquente de NF- $\kappa$ B et l'expression des médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages (*Growth regulated oncogene 1 a* (GRO 1a), MIP-2, RANTES) (Stewart et al., 2010). Il est possible d'envisager que la liaison du EP 80317 au CD36 pourrait interférer avec l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires en aval du CD36 ou de ses co-récepteurs exprimés par les macrophages. Li et al (2010) ont récemment montré que le CD36 est largement exprimé au niveau des cellules musculaires lisses aortiques de souris (Li et al., 2010). À ce niveau, le CD36 inhibe l'expression des enzymes anti-oxydantes, la peroxiredoxine-2 (Prdx2) et l'hème oxygénase-1 (HO-1), par une inhibition de la translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 (*NF-E2-related factor-2*) qui régule l'expression génique de ces enzymes (Li et al., 2010). Il est ainsi possible que le EP 80317 interfère avec ces voies pro-inflammatoires au niveau des cellules musculaires lisses aortiques réduisant l'inflammation vasculaire associée.

Il est important de souligner que les effets du EP 80317 décrits ci-haut ne sont pas observés chez les souris déficientes en CD36 ou au niveau des cellules qui en dérivent

(article I, Figure 2; article II, Figure 2, Figure 5). De plus, le tripeptide EP 51389, un analogue synthétique des GHRPs (*AIB-D2MeTrp-D2MeTrp-NH<sub>2</sub>*) (Torsello et al., 1998) dépourvu d'une affinité de liaison envers le CD36 n'empêche pas l'activation de Pyk2 induite par le POVPC (article II, Figure 2B). Ces résultats appuient le rôle du CD36 dans l'athérosclérose et dans l'inflammation vasculaire, et suggèrent qu'afin d'exercer leurs effets thérapeutiques, les GHRPs doivent se lier au CD36 pour réguler les fonctions médiées par ce dernier.

Les GHRPs sont des peptides synthétiques qui peuvent lier les récepteurs GHS-R1a et CD36 avec différentes affinités (Davenport et al., 2005 ; Demers et al., 2004 ; Bodart et al., 2002). L'affinité relative des GHRPs envers ces récepteurs et leurs activités semblent influencer l'effet anti-athérosclérotique de ces peptides. À titre d'exemple, le GHRP-2 (*DAla-DβNal-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH<sub>2</sub>*) est un puissant agoniste du GHS-R1a (Davenport et al., 2005) qui se lie aussi au récepteur CD36 (CI<sub>50</sub> = 1.79 ± 0.47 μM) (Demers et al., 2004). L'équipe de Delafontaine a testé l'effet d'un traitement prolongé (12 semaines) du GHRP-2 sur le développement de l'athérosclérose chez les souris apoE<sup>-/-</sup> nourries avec une diète de type Western (Titterton et al., 2009). Les résultats montrent que bien que le GHRP-2 réduit le stress oxydatif au niveau vasculaire et l'internalisation des lipides au niveau des macrophages *in vitro*, l'administration *in vivo* du peptide ne prévient pas le développement de l'athérosclérose (Titterton et al., 2009). Contrairement au EP 80317 (Marleau et al., 2005 ; Harb et al., 2009) et à l'hexaréline (Avallone et al., 2006), le GHRP-2 augmente la synthèse et sécrétion de l'hormone de croissance par stimulation du récepteur de la ghréline (Bowers, 2000). Les auteurs de cette étude ont suggéré qu'il est possible que les effets pléiotropiques du

GHRP-2 *in vivo* tamponnent les effets bénéfiques médiés en partie par le récepteur CD36 (Titterington et al., 2009). Il est ainsi évident que les différents GHRPs modulent le développement de l'athérosclérose de façon différente dépendamment de l'affinité relative envers le récepteur CD36 et GHS-R1a (Avallone et al., 2006 ; Titterington et al., 2009), les ligands sélectifs du CD36 montrant les effets anti-athérosclérotiques les plus puissants (Marleau et al., 2005 ; Harb et al., 2009 ).

### **8.3. Le récepteur CD36 de la microvasculature: un récepteur pro-inflammatoire**

Nos études, ainsi que celles d'autres groupes, suggèrent un rôle du CD36 dans la réponse inflammatoire de pathologies telles l'athérosclérose (Harb et al., 2009, Park et al., 2009), l'ischémie cérébrale (Kim et al., 2008; Cho et al., 2005) et la maladie d'Alzheimer (El Khoury et al., 2003). A ce jour, les mécanismes pro-inflammatoires liés à l'activation du CD36 ont été principalement élucidés au niveau des monocytes/macrophages et des microglies et très peu d'études ont documenté le rôle du CD36 exprimé par les cellules endothéliales de la microvasculature. En se basant sur des observations *in vitro* montrant que le CD36 de la microvasculature est un récepteur qui facilite l'internalisation de l'AA par une interaction avec des protéines inflammatoires S100A8/A9 (Kerkhoff et al., 2001), nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le CD36 de la microvasculature est un récepteur pro-inflammatoire. Chez deux modèles expérimentaux d'inflammation aiguë, nos résultats montrent un rôle du récepteur CD36 dans la régulation de l'extravasation des PMN au niveau des sites inflammatoires (article III).

En effet, comparées aux souris exprimant le récepteur CD36 (CD36<sup>+/+</sup>), les souris déficientes en CD36 ont été protégées contre le recrutement des PMN, associés aux dommages tissulaires dans le modèle d'I/R du membre inférieur droit chez la souris (article III, Figures 2 et 3) de même que dans le modèle de la poche d'air dorsale murine (article III, Figure 5). De plus, l'interférence avec la fonction du CD36 par l'utilisation des anticorps anti-CD36 a inhibé l'extravasation des PMN, appuyant le rôle pro-inflammatoire du récepteur CD36 (article III, Figure 5). Notons que les deux modèles inflammatoires utilisés sont différents et impliquent des stimuli pro-inflammatoires différents: génération de ROS, de médiateurs lipidiques et de chimiokines suite à la reperfusion dans le modèle d'I/R et utilisation d'un composant de la paroi bactérienne (LPS) dans le modèle de poche d'air. Néanmoins les deux modèles impliquent l'interaction des PMN avec l'endothélium de la microvasculature comme étape limitante dans l'extravasation des cellules inflammatoires.

L'utilisation des anticorps anti-S100A8/A9 nous a permis d'étudier l'implication de ce complexe protéique dans la médiation des effets pro-inflammatoires du CD36. Ainsi, la neutralisation de l'hétérodimère S100A8/A9 par des anticorps spécifiques a réduit l'accumulation des PMN au niveau des sites inflammatoires, au même niveau que celui observé avec les ligands synthétiques du CD36 ou avec les anticorps anti-CD36. L'association des deux traitements (anti-S100A8/A9 + EP 80317 ou anti-S100A8/A9 + anti-CD36) n'a eu aucun effet synergique ou additif, impliquant que les deux traitements interfèrent présumément avec la fonction d'un même récepteur, le CD36. De plus, l'utilisation des souris CD36<sup>-/-</sup> appuie nos conclusions, du fait que l'utilisation des



anticorps anti-S100A8/A9 ne s'accompagne par aucun effet anti-inflammatoire chez ces souris (article III, Figures 4 et 5).

Nos observations nous ont conduits à répondre à la question suivante: quelle est la nature de l'interaction entre le CD36 et les protéines S100A8/A9 responsable des effets pro-inflammatoires dépendants du CD36 *in vivo*?

Bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour élucider les mécanismes d'action du CD36 au niveau de la microvasculature, nous pouvons proposer certains mécanismes d'action en se basant sur nos observations et celles d'autres groupes. Soulignons-en les points d'intérêts suivants:

- Les PMN activés libèrent l'acide arachidonique sous l'action de la phospholipase A2 (PLA2) (Durstin et al., 1994) non seulement dans leur cytosol, mais également dans le milieu extracellulaire (Mullane et al., 1987). Il a été montré que *in vivo*, l'hétérodimère S100A8/A9 est sécrété complexé à l'AA (Duttaroy et al., 2003; Kannan et al., 2003) au contact de l'endothélium enflammé (Rammes et al., 1997; Frosch et al., 2000; Nacken et al., 2003).
- Le captage de l'acide arachidonique complexé à S100A8/A9 par les cellules endothéliales de la microvasculature est attribué à la fonction translocase du CD36. Ainsi, il a été montré que 1) la quantité d'AA internalisée dépend de l'équilibre entre la concentration en S100A8/A9-AA et la quantité du CD36 exprimée par les cellules; 2) le captage de l'acide arachidonique est inhibé par des inhibiteurs de la fonction translocase du CD36, tels que le SSO (sulfo-*N*-succinimidyl oléate); 3) les essais d'interaction protéine-protéine montrent une interaction directe de S100A8/A9 avec le CD36, suivie

par la dissociation du complexe S100A8/A9-AA et l'internalisation de l'AA par le CD36 (Kerkhoff et al., 2001; Eue and Sorg, 2001).

- Au cours de la réponse inflammatoire, les cellules endothéliales montrent une augmentation de la synthèse des écosanoïdes (Harizi et al., 2008) et utilisent pour ce faire non seulement l'AA endogène (intracellulaire), mais également l'AA et ses métabolites exogènes (Brady and Serhan, 1992; Karim et al., 1996; Folco and Murphy, 2006). La synthèse des écosanoïdes par métabolisme transcellulaire est largement démontrée pour les cellules endothéliales non seulement *in vitro* dans les systèmes de co-culture cellulaire avec les PMN, mais également *ex vivo* (Brady and Serhan, 1992; Post et al., 1993; Brady et al. 1995). De façon intéressante, les stimuli utilisés pour activer les PMN et déclencher le métabolisme transcellulaire par les cellules endothéliales, tels que le fMLP et l'ionophore de calcium A23187, sont les mêmes que ceux caractérisés pour induire la libération de l'hétérodimère S100A8/A9 à partir des PMN (Hetland et al., 1998, Kerkhoff et al., 1999). Notons que l'albumine est la protéine plasmatique la plus abondante, ayant une haute affinité de liaison pour les acides gras tels que l'AA (van der Vusse, 2009). Il est ainsi possible d'envisager que si l'AA est sécrété dans le milieu extracellulaire non complexé aux protéines S100A8/A9, il se retrouvera dans le milieu extracellulaire complexé à l'albumine, ce qui limitera sa diffusion au niveau des cellules voisines et son métabolisme transcellulaire (Krischer et al., 1994). De plus, Kerkhoff et al. (2001) ont montré que l'internalisation de l'AA par les cellules endothéliales transfectées par le CD36 est significativement plus élevée et plus rapide en présence des protéines S100A8/A9 qu'en présence de l'albumine bovine (BSA) (Kerkhoff et al., 2001). Cette étude a également appuyé le point que le transport

de l'AA via le CD36 est facilité par le complexe S100A8/A9 qui agit comme une protéine de transport des acides gras du fait que 1) la quantité d'AA internalisée dépend de l'équilibre entre la concentration en S100A8/A9-AA et la quantité du CD36 exprimée par les cellules; 2) le captage de l'AA est inhibé par des inhibiteurs de la fonction du CD36, tels que le SSO (sulfo-*N*-succinimidyl oléate); 3) les essais d'interaction protéine-protéine montrent une interaction directe de S100A8/A9 avec le CD36, suivie par la dissociation du complexe S100A8/A9-AA et l'internalisation de l'AA par le CD36 (Kerkhoff et al., 2001; Eue and Sorg, 2001).

Ainsi, nous proposons que les stimuli inflammatoires qui activent les PMN et les amènent en contact avec l'endothélium inflammé stimulent la libération de l'acide arachidonique et/ou du LTA4 par les leucocytes activés. Cet acide gras ou son métabolite sont transportés dans le milieu extracellulaire par l'hétérodimère S100A8/A9. Le complexe S100A8/A9-AA (ou S100A8/A9-LTA4) est reconnu par les cellules endothéliales de la microvasculature via une interaction avec le CD36, qui favorise la dissociation du complexe et active l'internalisation de l'acide arachidonique et/ou du LTA4 dans les cellules endothéliales. La synthèse des écosanoïdes et l'exacerbation de la réponse inflammatoire s'ensuit, tel que observé dans nos modèle d'I/R des membres inférieurs ou de poche d'air chez les souris exprimant le récepteur CD36 (article III, Figure 6). Notons qu'il est important de vérifier dans nos études à venir si la migration des leucocytes au niveau des tissus inflammatoires étudiés, tels que les poumons reperfusés, s'accompagne par la détection du complexe S100A8/A9 au niveau des cellules endothéliales de la microvasculature et par une augmentation de la synthèse tissulaire des leucotriènes. Ceci pourrait être réalisé par immunohistochimie à

l'aide d'anticorps anti-S100A8/A9 et par extraction tissulaire et détection des métabolites de l'AA par HPLC (*High-performance liquid chromatography*) couple a un détecteur de MS ou ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Il est également important de vérifier *in vitro* si un métabolisme transcellulaire est observé au niveau des cellules endothéliales de manière dépendante du CD36. Ceci pourrait être réalisé en utilisant un modèle de co-culture de cellules endothéliales microvasculaires et de PMN incubés avec de l'acide arachidonique radiomarké puis activés de manière à libérer le complexe S100A8/A9-AA (activation des PMN par C5a, fMLP).

Les protéines S100A8/A9 sont également impliquées dans l'activation de l'enzyme oxydante NADPH; l'AA internalisé active l'assemblage des sous-unités cytosoliques à celles membranaires et augmente l'activité oxydative de l'enzyme (Meyer and Schmitt, 2000; Babior, 2001; Doussiere et al., 2002). Il est ainsi possible que dans notre modèle expérimental, l'interférence avec la fonction CD36 chez les souris traitées par le EP 80317 ou un anticorps anti-CD36 s'accompagne par une réduction de l'activation de la NADPHox des cellules endothéliales. Il sera également intéressant de vérifier dans des études futures, si une réduction de la génération des ROS est observée au niveau tissulaire de manière dépendante du CD36, par le dosage des produits d'oxydation tissulaire, tel que le malonyldaldéhyde (MDA) (Ohkawa et al., 1979) et par l'évaluation de l'activité enzymatique de la NADPHox au niveau des microvaisseaux isolés de la poche d'air (Li et al., 2006).

Dans le modèle d'I/R cérébrale, il a été montré que le CD36 est responsable de la génération de ROS, la sécrétion de cytokines et chimiokines (Cho et al., 2005; Kim et al., 2008), l'infiltration de neutrophiles dans les lésions post-ischémiques (Kunz et al.,

2008), et que les souris CD36<sup>-/-</sup> sont protégées contre les dommages tissulaires post-ischémiques (Cho et al., 2005; Kunz et al., 2008). Dans leur discussion, Kunz et al s'interrogent sur la nature des ligands endogènes du CD36 qui pourraient être générés dans ce contexte d'I/R. Il est possible que nos observations répondent à leurs interrogations et que les complexes S100A8/A9-AA ou S100A8/A9-LTA4, sécrétés par les PMN ayant infiltré les régions cérébrales après la reperfusion soient responsables des effets pro-inflammatoires observés qui sont dépendants de la présence du CD36.

Ainsi, nos résultats montrent que l'utilisation de ligands spécifiques du CD36 pourrait potentiellement avoir des applications thérapeutiques s'étendant au traitement des inflammations aiguës post-ischémiques, considérant que l'utilisation du EP 80317 et du EP 80318 a réduit le recrutement des leucocytes aux sites inflammatoires (article III, Figures 2, 3 et 5). Étant donné que le site de liaison des GHRPs au CD36 (résidus 132-169) (Demers et al., 2004) chevauche celui des acides gras à longues chaînes (résidus 127-279) (Baillie et al., 1996; Hwang et al., 1998; Rac et al., 2007), il est possible que l'effet anti-inflammatoire résulte de l'inhibition de la fonction du CD36.

## 8.4. Conclusions

Les principales observations réalisées dans le cadre de nos études sont les suivantes :

1- Le récepteur CD36 est fortement impliqué dans le développement de l'athérosclérose et régule le recrutement des phagocytes mononucléés au niveau des lésions athérosclérotiques ainsi que l'inflammation vasculaire associée à l'athérosclérose.

2- Les ligands synthétiques du CD36 protègent contre le développement de l'athérosclérose, et exercent des effets protecteurs pléiotropiques.

3- Le récepteur CD36, exprimé au niveau des cellules endothéliales de la microvasculature, module l'accumulation des leucocytes polymorphonucléés (neutrophiles) au niveau des sites inflammatoires.

Ainsi, nos études ont permis de définir les mécanismes des effets protecteurs anti-athérosclérotiques et anti-inflammatoires des ligands synthétiques du CD36 dans différents modèles expérimentaux. Nous avons également montré un rôle pour le récepteur CD36 exprimé par les phagocytes circulants dans leur recrutement au foyer inflammatoire. Nos travaux appuient le développement de ligands sélectifs du CD36, ce récepteur pouvant représenter une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de l'athérosclérose, mais aussi possiblement dans certains désordres associés à une réponse inflammatoire aiguë.

## **Chapitre 9. Perspectives générales**

Nos résultats ont montré un rôle important du CD36 dans le développement précoce des lésions avec un effet préventif des ligands sélectifs du CD36 dans la formation des cellules spumeuses. Cependant, un délai dans l'initiation du traitement de 8 semaines par rapport à l'introduction de la diète enrichie en lipides et en cholestérol a montré des effets anti-athérosclérotiques importants, suggérant des effets curatifs à des phases plus avancées de la pathologie. Il est bien connu que la phase tardive de l'athérosclérose est

associée à l'athéromatose. Notons qu'il est établi que les PCox<sub>CD36</sub> retrouvés au niveau plasmatique des souris apoE<sup>-/-</sup> se lient aux plaquettes via le CD36 et induisent l'activation de ces dernières et l'induction d'un état prothrombotique *in vivo* (Podrez et al., 2007). De plus, comparées aux plaquettes des souris de type sauvage, les plaquettes des souris hypercholestérolémiques sont activées et présentent des niveaux de base élevés de JNK, et l'exposition des plaquettes au LDLox induit une phosphorylation de JNK dépendante du CD36. De façon intéressante, les souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> sont protégées contre la formation de thrombose dans le modèle de thrombose de l'artère carotide (Chen et al., 2008). Il sera ainsi intéressant 1) de vérifier *in vitro* le niveau basal de JNK dans les plaquettes isolées de souris prétraitées pendant 12 semaines au EP 80317; 2) d'étudier *in vitro* l'effet d'une pré-incubation des plaquettes avec le EP 80317 sur la phosphorylation de JNK et sur l'activation des plaquettes (stimulation avec ADP, expression de l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 et de la sélectine-P); et 3) de vérifier *in vivo* le potentiel effet anti-thrombotique du EP 80317 dans le modèle de thrombose de l'artère carotide des souris apoE<sup>-/-</sup>.

Une autre avenue potentiellement intéressante à poursuivre concerne les dommages associés à l'ischémie cérébrale. En fait, les lésions cérébrales faisant suite à l'ischémie/reperfusion cérébrale sont en corrélation avec l'accumulation des PMN dans les tissus reperfusés (Kochanek et al., 1992). Il a été montré que l'accumulation des PMN est rapide, fait suite à leur interaction avec l'endothélium de la microvasculature cérébrale (Hallenbeck et al., 1986; Obrenovitch et al., 1984) et que cette interaction s'associe avec l'activation des cellules (Kochanek et al., 1992). De façon intéressante, le complexe S100A8/A9 est également détecté dans les lésions cérébrales post-

ischémiques (Postler et al., 1997). Dans le modèle de cerveau perfusé *ex vivo*, la présence de PMN stimulés dans le tampon de perfusion active le métabolisme transcellulaire des cellules endothéliales de la microvasculature cérébrale qui deviennent capables de synthétiser le LTC<sub>4</sub> et le LTB<sub>4</sub> (Di Gennaro et al., 2004; Folco et al., 2006). Notons que les PMN stimulés sécrètent plus de 50% du LTA<sub>4</sub> synthétisé (Sala et al., 1996) et que le LTA<sub>4</sub> est stabilisé dans le milieu extracellulaire par les protéines S100A8/A9 (Rector et al., 2009). Il est donc possible que les PMN activés au contact de l'endothélium cérébral sécrètent le complexe S100A8/A9/LTA<sub>4</sub> qui est internalisé dans les cellules endothéliales de la microvasculature cérébrale via le CD36, afin de synthétiser le LTB<sub>4</sub> et intensifier la migration des PMN au niveau des lésions. Cette hypothèse est appuyée par le fait que dans le modèle d'I/R cérébrale, les souris déficientes en CD36 présentent des zones d'infarctus plus petites que celles des souris exprimant le récepteur (Cho et al., 2005; Kunz et al., 2008) et une quantité de PMN infiltrant les lésions réduite de 86% (Kunz et al., 2008). Il serait intéressant de tester les effets du EP 80317 et des anticorps anti-S100A8/A9 dans la protection contre les dommages associés à l'I/R cérébrale, notamment au niveau de l'infiltration des PMN.



## Références

- Abumrad,N.A., El-Maghrabi,M.R., Amri,E.Z., Lopez,E., and Grimaldi,P.A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* 268, 17665-17668.
- Aikawa,M. and Libby,P. (2004). Lipid lowering therapy in atherosclerosis. *Semin. Vasc. Med.* 4, 357-366.
- Albert,M.L., Pearce,S.F., Francisco,L.M., Sauter,B., Roy,P., Silverstein,R.L., and Bhardwaj,N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188, 1359-1368.
- Allen,M.H., Barker,J.N., and MacDonald,D.M. (1991). Keratinocyte expression of CD36 antigen in benign and malignant epidermal cell-derived tumours. *J. Cutan. Pathol.* 18, 198-203.
- Anderson,T.J. (1999). Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* . 34:631-638.
- Andersen,M., Lenhard, B., Eriksson, P., Odeberg, J. (2006). Alternative promoter usage of the membrane glycoprotein CD36. *BMC Mol Biol Mer* 3:8.
- Aota,Y., Sumi,M., Iguchi,T., Okabe,S., Gotoh,A., and Ohyashiki,K. (2004). Type I CD36 deficiency in hematologic disorder. *Haematologica* 89, EIM17.
- Armesilla,A.L. and Vega,M.A. (1994). Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 269, 18985-18991.
- Asch,A.S., Liu,I., Briccetti,F.M., Barnwell,J.W., Kwakye-Berko,F., Dokun,A., Goldberger,J., and Pernambuco,M. (1993). Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science* 262, 1436-1440.
- Ashraf,M.Z., Kar,N.S., and Podrez,E.A. (2009). Oxidized phospholipids: biomarker for cardiovascular diseases. *Int. J Biochem. Cell Biol* 41, 1241-1244.
- Audran,R., Collet,B., Moisan,A., and Toujas,L. (1995). Fate of mouse macrophages radiolabelled with PKH-95 and injected intravenously. *Nucl Med Biol* 22, 817-821.
- Auerbach BJ, Bisgaier CL, Wolle J, Saxena J. (1996) Oxidation of low density lipoproteins greatly enhances their association with lipoprotein lipase anchored to endothelial cell matrix. *J Biol Chem* 271:1329–1335
- Avallone,R., Demers,A., Rodrigue-Way,A., Bujold,K., Harb,D., Anghel,S., Wahli,W., Marleau,S., Ong,H., and Tremblay,A. (2006). A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Mol. Endocrinol.* 20, 3165-3178.

- Babior, B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.
- Baillie, A.G., Coburn, C.T., and Abumrad, N.A. (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J. Membr. Biol.* 153, 75-81.
- Baldanzi, G., Filigheddu, N., Cutrupi, S., Catapano, F., Bonisconi, S., Fubini, A., Malan, D., Baj, G., Granata, R., Broglio, F., Papotti, M., Surico, N., Bussolino, F., Isgaard, J., Deghenghi, R., Sinigaglia, F., Prat, M., Muccioli, G., Ghigo, E., and Graziani, A. (2002). Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159, 1029-1037.
- Bamberger, M.E., Harris, M.E., McDonald, D.R., Husemann, J., and Landreth, G.E. (2003). A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J. Neurosci.* 23, 2665-2674.
- Baranova, I.N., Kurlander, R., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Chen, Z., Remaley, A.T., Csako, G., Patterson, A.P., and Eggerman, T.L. (2008). Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J. Immunol.* 181, 7147-7156.
- Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A., Marme, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* 87:3336-3343.
- Barrett, L., Dai, C., Gamberg, J., Gallant, M., and Grant, M. (2007). Circulating CD14-CD36<sup>+</sup> peripheral blood mononuclear cells constitutively produce interleukin-10. *J Leukoc. Biol* 82, 152-160.
- Baruzzi, A., Cavegion, E., and Berton, G. (2008). Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci* 65, 2175-2190.
- Basta, G., Schmidt, A.M., and de, C.R. (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* 63, 582-592.
- Beaven, S.W. and Tontonoz, P. (2006). Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. *Annu. Rev. Med.* 57, 313-329.
- Beaudeux, J.L., Delattre, P., Therond, D., Bonnefont-Rousselot, A., and Legrand, J.P. (2006). Oxidative stress in the atherosclerotic process. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 21, 144-150.
- Benton, C.R., Holloway, G.P., Campbell, S.E., Yoshida, Y., Tandon, N.N., Glatz, J.F., Luiken, J.J., Spriet, L.L., and Bonen, A. (2008). Rosiglitazone increases fatty acid oxidation and fatty acid translocase (FAT/CD36) but not carnitine palmitoyltransferase I in rat muscle mitochondria. *J. Physiol* 586, 1755-1766.

Berliner, J.A. and Gharavi, N.M. (2008). Endothelial cell regulation by phospholipid oxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 119-123.

Berliner, J.A., Gharavi, N.M. (2008) Lipoprotein-matrix interactions in macrovascular disease in diabetes. Endothelial cell regulation by phospholipid oxidation products. *Free Radic Biol Med.* 45(2):119-23.

Berliner, J.A., Leitinger, N., and Tsimikas, S. (2009). The role of oxidized phospholipids in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 *Suppl*, S207-S212.

Bernal-Mizrachi, L., Jy, W., Jimenez, J.J., Pastor, J., Mauro, L.M., Horstman, L.L., de, M.E., and Ahn, Y.S. (2003). High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am. Heart J.* 145, 962-970.

Bessi, V., Bujold, K., Marleau, S., and Ong, H. (2007). EP 80318: A Novel CD36 Ligand with Hypocholesterolemic and Anti-Atherosclerotic Properties in Apoe-Null Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27. Abstract.

Blankenberg, S., Barbaux, S., and Tiret, L. (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170, 191-203.

Bobryshev, Y.V. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron* 37, 208-222.

Bochkov, V.N., Mechtcheriakova, D., Lucerna, M., Huber, J., Malli, R., Graier, W.F., Hofer, E., Binder, B.R., Leitinger, N. (2002). Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca(++)/NFAT. *Blood*. 99:199–206.

Bochkov, V.N., Philippova, M., Oskolkova, O., Kadl, A., Furnkranz, A., Karabeg, E., Afonyushkin, T., Gruber, F., Breuss, J., Minchenko, A., Mechtcheriakova, D., Hohensinner, P., Rychli, K., Wojta, J., Resink, T., Erne, P., Binder, B.R., Leitinger, N. (2006). Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via autocrine mechanisms, implicating a novel role for lipid oxidation in the evolution of atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 99: 900–908.

Bochkov, V.N., Oskolkova, O.V., Birukov, K.G., Levonen, A.L., Binder, C.J., Stöckl, J. (2010). Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid Redox Signal.* 12(8):1009-59.

Bodart, V., Bouchard, J.F., McNicoll, N., Escher, E., Carriere, P., Ghigo, E., Sejlitz, T., Sirois, M.G., Lamontagne, D., and Ong, H. (1999). Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ. Res.* 85, 796-802.

Bodart, V., Febbraio, M., Demers, A., McNicoll, N., Pohankova, P., Perreault, A., Sejlitz, T., Escher, E., Silverstein, R.L., Lamontagne, D., and Ong, H. (2002). CD36

mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ. Res.* 90, 844-849.

Bogatcheva, N.V., Sergeeva, M.G., Dudek, S.M., and Verin, A.D. (2005). Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc. Res* 69, 107-127.

Bojesen, I.N., Bojesen, E. (1994). Binding of arachidonate and oleate to bovine serum albumin. *J Lipid Res.* 35(5):770-8.

Bonen, A., Dyck, D.J., Ibrahimi, A., and Abumrad, N.A. (1999). Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am. J. Physiol* 276, E642-E649.

Bonen, A., Luiken, J.J., Arumugam, Y., Glatz, J.F., and Tandon, N.N. (2000). Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J. Biol. Chem.* 275, 14501-14508.

Bonen, A., Parolin, M.L., Steinberg, G.R., Calles-Escandon, J., Tandon, N.N., Glatz, J.F., Luiken, J.J., Heigenhauser, G.J., and Dyck, D.J. (2004). Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J.* 18, 1144-1146.

Bonen, A., Tandon, N.N., Glatz, J.F., Luiken, J.J., and Heigenhauser, G.J. (2006). The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Obes. (Lond)* 30, 877-883.

Bonetti, P.O., Lerman, L.O., and Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 168-175.

Bonheur, J.A., Albadawi, H., Patton, G.M., and Watkins, M.T. (2004). A noninvasive murine model of hind limb ischemia-reperfusion injury. *J Surg. Res* 116, 55-63.

Bonnet, J. (2005). Atherosclerosis. *EMC-Cardiologie Angéiologie* 2, 436-458.

Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003) Radicaux libres et antioxydants. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC, eds. *Biochimie pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires*. Paris : Flammarion, Médecine/Sciences: 59-81.

Bouhrel, M.A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2007). PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 6, 137-143.

Bouhrel, M.A., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptors--from active regulators of macrophage biology to pharmacological targets in the treatment of cardiovascular disease. *J. Intern. Med.* 263, 28-42.

- Boullier,A., Gillotte,K.L., Horkko,S., Green,S.R., Friedman,P., Dennis,E.A., Witztum,J.L., Steinberg,D., and Quehenberger,O. (2000). The binding of oxidized low density lipoprotein to mouse CD36 is mediated in part by oxidized phospholipids that are associated with both the lipid and protein moieties of the lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 275, 9163-9169.
- Bowers,C.Y. (1998). Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Mol. Life Sci.* 54, 1316-1329.
- Bowers,C.Y. (2000). Growth hormone releasing peptides: physiology and clinical applications. *Curr Opin Endocrinol Diabetes.* 7:168–174.
- Brady,H.R. and Serhan,C.N. (1992). Adhesion promotes transcellular leukotriene biosynthesis during neutrophil-glomerular endothelial cell interactions: inhibition by antibodies against CD18 and L-selectin. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 186, 1307-1314.
- Brady,H.R., Lamas,S., Papayianni,A., Takata,S., Matsubara,M., and Marsden,P.A. (1995). Lipoxygenase product formation and cell adhesion during neutrophil-glomerular endothelial cell interaction. *Am J Physiol* 268, F1-12.
- Brash,A.R. (2001). Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin. Invest* 107, 1339-1345.
- Braun,A., Trigatti,B.L., Post,M.J., Sato,K., Simons,M., Edelberg,J.M., Rosenberg,R.D., Schrenzel,M., and Krieger,M. (2002). Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ. Res* 90, 270-276.
- Braunersreuther,V. and Mach,F. (2006). Leukocyte recruitment in atherosclerosis: Potential targets for therapeutic approaches? *Cell Mol Life Sci* 63, 2079-2088.
- Brinkmann,J.F., Abumrad,N.A., Ibrahimi,A., Van der Vusse,G.J., and Glatz,J.F. (2002). New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36. *Biochem. J.* 367, 561-570.
- Bruni,F., Pasqui,A.L., Pastorelli,M., Bova,G., Cercignani,M., Palazzuoli,A., Sawamura,T., Gioffre,W.R., Auteri,A., and Puccetti,L. (2005). Different effect of statins on platelet oxidized-LDL receptor (CD36 and LOX-1) expression in hypercholesterolemic subjects. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 11, 417-428.
- Bui, M.N, Sack, M.N., Moutsatsos, G. Autoantibody titers to oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary atherosclerosis (1996). *Am Heart J* 131, 663–667.
- Bujold,K., Rhainds,D., Jossart,C., Febbraio,M., Marleau,S., and Ong,H. (2009). CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc. Res.* 83, 457-464.

Burnett,M.S., Gaydos,C.A., Madico,G.E., Glad,S.M., Paigen,B., Quinn,T.C., and Epstein,S.E. (2001). Atherosclerosis in apoE knockout mice infected with multiple pathogens. *J. Infect. Dis.* 183, 226-231.

Cai,H. and Harrison,D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87, 840-844.

Cai,H., Griendling,K.K., and Harrison,D.G. (2003). The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24, 471-478.

Calvo,D., Gomez-Coronado,D., Suarez,Y., Lasuncion,M.A., and Vega,M.A. (1998). Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* 39, 777-788.

Camejo,G., Fager,G., Rosengren,B., Hurt-Camejo,E., and Bondjers,G. (1993). Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 268, 14131-14137.

Campbell,J.J., Qin,S., Bacon,K.B., Mackay,C.R., and Butcher,E.C. (1996). Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol* 134, 255-266.

Campbell,S.E., Tandon,N.N., Woldegiorgis,G., Luiken,J.J., Glatz,J.F., and Bonen,A. (2004). A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 36235-36241.

Cannon, C.P. (2005). The ideal Cholesterol. Lower is Better. *JAMA.* 294:2492-2494.

Carr,A.C., McCall,M.R., and Frei,B. (2000). Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1716-1723.

Chabowski,A., Coort,S.L., Calles-Escandon,J., Tandon,N.N., Glatz,J.F., Luiken,J.J., and Bonen,A. (2004). Insulin stimulates fatty acid transport by regulating expression of FAT/CD36 but not FABPpm. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 287, E781-E789.

Chang,M.K., Bergmark,C., Laurila,A., Horkko,S., Han,K.H., Friedman,P., Dennis,E.A., and Witztum,J.L. (1999). Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 96, 6353-6358.

Charo,I.F. (2007). Macrophage polarization and insulin resistance: PPARgamma in control. *Cell Metab* 6, 96-98.

Chawla,A., Barak,Y., Nagy,L., Liao,D., Tontonoz,P., and Evans,R.M. (2001a). PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat. Med.* 7, 48-52.

Chawla,A., Boisvert,W.A., Lee,C.H., Laffitte,B.A., Barak,Y., Joseph,S.B., Liao,D., Nagy,L., Edwards,P.A., Curtiss,L.K., Evans,R.M., and Tontonoz,P. (2001b). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell* 7, 161-171.

Chawla,A., Repa,J.J., Evans,R.M., and Mangelsdorf,D.J. (2001c). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866-1870.

Chen,M., Yang,Y., Braunstein,E., Georgeson,K.E., and Harmon,C.M. (2001a). Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 281, E916-E923.

Chen,Z., Ishibashi,S., Perrey,S., Osuga,J., Gotoda,T., Kitamine,T., Tamura,Y., Okazaki,H., Yahagi,N., Iizuka,Y., Shionoiri,F., Ohashi,K., Harada,K., Shimano,H., Nagai,R., and Yamada,N. (2001b). Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 372-377.

Chen,M., Yang,Y.K., Loux,T.J., Georgeson,K.E., and Harmon,C.M. (2006). The role of hyperglycemia in FAT/CD36 expression and function. *Pediatr. Surg. Int.* 22, 647-654.

Chen,K., Febbraio,M., Li,W., and Silverstein,R.L. (2008). A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circ. Res.* 102, 1512-1519.

Cherepanova, O.A., Pidkovka, N.A., Sarmiento, O.F., Yoshida, T., Gan, Q., Adiguzel, E., Bendeck, M.P., Berliner, J., Leitinger, N., Owens, G.K. (2009). Oxidized phospholipids induce type VIII collagen expression and vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 104: 609–618.

Chinetti-Gbaguidi, G., Fruchart,J.C., and Staels,B. (2006). Transcriptional regulation of macrophage cholesterol trafficking by PPAR $\alpha$  and LXR. *Biochemical Society Transactions* 34 (6): 1128-31.

Chinetti-Gbaguidi, G., Boulel,M.A., and Staels,B. (2007). Hétérogénéité des macrophages dans l'athérosclérose : une nouvelle cible thérapeutique ? La lettre de la NSFA, 30.

Chisolm,G.M. and Steinberg,D. (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1815-1826.

Cho,S., Park,E.M., Febbraio,M., Anrather,J., Park,L., Racchumi,G., Silverstein,R.L., and Iadecola,C. (2005). The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 25, 2504-2512.



Choudhury,R.P., Lee,J.M., and Greaves,D.R. (2005). Mechanisms of disease: macrophage-derived foam cells emerging as therapeutic targets in atherosclerosis. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2, 309-315.

Clahsen,T. and Schaper,F. (2008). Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *J Leukoc. Biol* 84, 1521-1529.

Clezardin,P., Frappart,L., Clerget,M., Pechoux,C., and Delmas,P.D. (1993). Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res.* 53, 1421-1430.

Cohn,Z.A. (1978). Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J Immunol.* 121, 813-816.

Collard,C.D., Lekowski,R., Jordan,J.E., Agah,A., and Stahl,G.L. (1999). Complement activation following oxidative stress. *Mol. Immunol.* 36, 941-948.

Collins,P.D., Marleau,S., Griffiths-Johnson,D.A., Jose,P.J., and Williams,T.J. (1995). Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 182, 1169-1174.

Collins,R.F., Touret,N., Kuwata,H., Tandon,N.N., Grinstein,S., and Trimble,W.S. (2009). Uptake of oxidized low density lipoprotein by CD36 occurs by an actin-dependent pathway distinct from macropinocytosis. *J Biol Chem.* 284, 30288-30297.

Collot-Teixeira,S., Martin,J., McDermott-Roe,C., Poston,R., and McGregor,J.L. (2007a). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 75, 468-477.

Collot-Teixeira,S., De,L.F., and McGregor,J.L. (2007b). Scavenger receptor A and CD36 are implicated in mediating platelet activation induced by oxidized low- density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2491-2492.

Connelly,M.A., Kellner-Weibel,G., Rothblat, G.H., Williams, D.L. (2003). SR-BI-directed HDL- cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res.* 44: 331-341.

Cooper,D., Stokes,K.Y., Taylor,A., and Granger,D.N. (2002). Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc. Toxicol.* 2, 165-180.

Coort,S.L., Hasselbaink,D.M., Koonen,D.P., Willems,J., Coumans,W.A., Chabowski,A., Van der Vusse,G.J., Bonen,A., Glatz,J.F., and Luiken,J.J. (2004). Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Diabetes* 53, 1655-1663.

Coraci,I.S., Husemann,J., Berman,J.W., Hulette,C., Dufour,J.H., Campanella,G.K., Luster,A.D., Silverstein,S.C., and El-Khoury,J.B. (2002). CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate

production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am. J. Pathol.* 160, 101-112.

Cornillon,J., Campos,L., and Guyotat,D. (2003). Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein. *Med. Sci (Paris)* 19, 743-752.

Corpeleijn,E., van der Kallen,C.J., Kruijshoop,M., Magagnin,M.G., de Bruin,T.W., Feskens,E.J., Saris,W.H., and Blaak,E.E. (2006). Direct association of a promoter polymorphism in the CD36/FAT fatty acid transporter gene with Type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. *Diabet. Med.* 23, 907-911.

Covey,S.D., Krieger,M., Wang,W., Penman,M., and Trigatti,B.L. (2003). Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1589-1594.

Cuchel,M. and Rader,D.J. (2006). Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 113, 2548-2555.

Curtiss,L.K. (2009). Reversing atherosclerosis? *N. Engl. J. Med.* 360, 1144-1146.

Davenpeck,K.L., Gauthier,T.W., Albertine,K.H., and Lefer,A.M. (1994). Role of P-selectin in microvascular leukocyte-endothelial interaction in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 267, H622-H630.

Davenport, A.P., Bonner, T.I., Foord, S.M., Harmar, A.J., Neubig, R.R., Pin, J.P., Spedding, M., Kojima, M., Kangawa, K. (2005). International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev.* 57:541–546.

Davidson, M.H., Robinson,J.G. (2007). Safety of aggressive lipid management. *J Am Coll Cardiol* 49:1753–1762.

Dawson,D.W., Pearce,S.F., Zhong,R., Silverstein,R.L., Frazier,W.A., and Bouck,N.P. (1997). CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J. Cell Biol.* 138, 707-717.

De Gennaro-Colonna,V., Rossoni,G., Cocchi,D., Rigamonti,A.E., Berti,F., and Muller,E.E. (2000). Endocrine, metabolic and cardioprotective effects of hexarelin in obese Zucker rats. *J Endocrinol.* 166, 529-536.

De Nichilo,M.O. and Yamada,K.M. (1996). Integrin alpha v beta 5-dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. *J Biol Chem.* 271, 11016-11022.

de Oliveira,S.C., Delbosc,S., Arais,C., Monnier,L., Cristol,J.P., and Pares-Herbute,N. (2008). Modulation of CD36 protein expression by AGEs and insulin in aortic VSMCs from diabetic and non-diabetic rats. *Nutr. Metab Cardiovasc. Dis.* 18, 23-30.

de Villiers,W.J. and Smart,E.J. (1999). Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J Leukoc. Biol* 66, 740-746.

de Winther,M.P.J., van Dijk,K.W., van Vlijmen,B.J.M., Gijbels,M.J.J., Heus,J.J., Wijers,E.R., van den Bos,A.C., Breuer,M., Frants,R.R., Havekes,L.M., and Hofker,M.H. (1999). Macrophage specific overexpression of the human macrophage scavenger receptor in transgenic mice, using a 180-kb yeast artificial chromosome, leads to enhanced foam cell formation of isolated peritoneal macrophages. *Atherosclerosis* 147, 339-347.

Deghenghi,R., Cananzi,M.M., Torsello,A., Battisti,C., Muller,E.E., and Locatelli,V. (1994). GH-releasing activity of Hexarelin, a new growth hormone releasing peptide, in infant and adult rats. *Life Sci.* 54, 1321-1328.

Demers,A., McNicoll,N., Febbraio,M., Servant,M., Marleau,S., Silverstein,R., and Ong,H. (2004). Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem. J.* 382, 417-424.

Di Gennaro, A., Carnini,C., Buccellati,C., Ballerio,R., Zarini,S., Fumagalli,F., Viappiani,S., Librizzi,L., Hernandez,A., Murphy,R.C., Constantin,G., De,C.M., Folco,G., and Sala,A. (2004). Cysteinyl-leukotrienes receptor activation in brain inflammatory reactions and cerebral edema formation: a role for transcellular biosynthesis of cysteinyl-leukotrienes. *Faseb J* 18, 842-844.

Diaz,M.N., Frei,B., Vita,J.A., and Keaney,J.F., Jr. (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 337, 408-416.

Dixit,V.D., Schaffer,E.M., Pyle,R.S., Collins,G.D., Sakthivel,S.K., Palaniappan,R., Lillard,J.W., Jr., and Taub,D.D. (2004). Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin. Invest* 114, 57-66.

Doi,T., Higashino, K., Kurihara, Y., Wada, Y., Miyazaki, T., Nakamura, H., Uesugi, S., Imanishi, T., Kawabe, Y., Itakura, H. (1993) Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem* 268:2126-2133.

Dolinsky,V.W. and Dyck, J. (2006). Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2557-H2569.

Doussiere,J., Bouzidi,F., and Vignais,P.V. (2002). The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils. *Eur. J. Biochem.* 269, 3246-3255.

Drew,A. (2000). Animal Models of Diet-Induced Atherosclerosis. In *Atherosclerosis: Experimental Methods and Protocols*.

- Dunne, J. L., Ballantyne, C. M., Beaudet, A. L., Ley, K. (2002). Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*. 99(1):336-41.
- Durstin,M., Durstin,S., Molski,T.F., Becker,E.L., and Sha'afi,R.I. (1994). Cytoplasmic phospholipase A2 translocates to membrane fraction in human neutrophils activated by stimuli that phosphorylate mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 91, 3142-3146.
- Duong, L.T, Rodan,G.A. (2000). PYK2 is an adhesion kinase in macrophages, localized in podosomes and activated by beta(2)-integrin ligation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 47(3):174-88.
- Duttaroy, A. (2003) Arachidonic Acid Binding Proteins in Human Neutrophils. In *Cellular Proteins and Their Fatty Acids in Health and Disease*, 285-386.
- Dyck,D.J., Steinberg,G., and Bonen,A. (2001). Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 281, E600-E607.
- Ehehalt,R., Sparla,R., Kulaksiz,H., Herrmann,T., Fullekrug,J., and Stremmel,W. (2008). Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts). *BMC. Cell Biol.* 9, 45.
- El Khoury,J.B., Moore,K.J., Means,T.K., Leung,J., Terada,K., Toft,M., Freeman,M.W., and Luster,A.D. (2003). CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J. Exp. Med.* 197, 1657-1666.
- Endemann,G., Stanton,L.W., Madden,K.S., Bryant,C.M., White,R.T., and Protter,A.A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 11811-11816.
- Englyst,N.A., Taube,J.M., Aitman,T.J., Baglin,T.P., and Byrne,C.D. (2003). A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation. *Diabetes* 52, 1248-1255.
- Eriksson,E.E., Xie,X., Werr,J., Thoren,P., and Lindbom,L. (2001). Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp. Med.* 194, 205-218.
- Eriksson,E.E. (2004). Mechanisms of leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions: future prospects. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 553-558.
- Erridge,C. (2009). CD36: promotion from scavenger receptor to mediator of migration? *Cardiovasc. Res.* 83, 5-6.
- Eue,I. and Sorg,C. (2001). Arachidonic acid specifically regulates binding of S100A8/9, a heterodimer complex of the S100 class of calcium binding proteins, to human microvascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 154, 505-508.

Eyre,N.S., Cleland,L.G., Tandon,N.N., and Mayrhofer,G. (2007). Importance of the carboxyl terminus of FAT/CD36 for plasma membrane localization and function in long-chain fatty acid uptake. *J. Lipid Res.* 48, 528-542.

Faccioli,L.H., Nourshargh,S., Moqbel,R., Williams,F.M., Sehmi,R., Kay,A.B., and Williams,T.J. (1991). The accumulation of In-111 eosinophils induced by inflammatory mediators, invivo. *Immunology* 73, 222-227.

Fan,J. and Watanabe,T. (2003). Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 10, 63-71.

Fan,X., Bradbury,M.W., and Berk,P.D. (2003). Leptin and insulin modulate nutrient partitioning and weight loss in ob/ob mice through regulation of long-chain fatty acid uptake by adipocytes. *J. Nutr.* 133, 2707-2715.

Farhangkhoe,H., Khan,Z.A., Barbin,Y., and Chakrabarti,S. (2005). Glucose-induced up-regulation of CD36 mediates oxidative stress and microvascular endothelial cell dysfunction. *Diabetologia* 48, 1401-1410.

Faus,H, Haendler,B. (2006). Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60:520-528.

Febbraio,M., Abumrad,N.A., Hajjar,D.P., Sharma,K., Cheng,W., Pearce,S.F., and Silverstein,R.L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 274, 19055-19062.

Febbraio,M., Podrez,E.A., Smith,J.D., Hajjar,D.P., Hazen,S.L., Hoff,H.F., Sharma,K., and Silverstein,R.L. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J. Clin. Invest* 105, 1049-1056.

Febbraio,M., Guy,E., and Silverstein,R.L. (2004). Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2333-2338.

Febbraio,M. and Silverstein,R.L. (2007). CD36: implications in cardiovascular disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 2012-2030.

Feng,J., Han,J., Pearce,S.F., Silverstein,R.L., Gotto,A.M., Jr., Hajjar,D.P., and Nicholson,A.C. (2000). Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J. Lipid Res.* 41, 688-696.

Fiévet,C., Staels,B.(2009). Efficacy of peroxisome proliferator-activated receptor agonists in diabetes and coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep.* 11(4):281-8.

Folco,G. and Murphy,R.C. (2006). Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol. Rev.* 58, 375-388.

Frank,P.G., Lee,H., Park,D.S., Tandon,N.N., Scherer,P.E., and Lisanti,M.P. (2004). Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 98-105.

Franke-Fayard,B., Janse,C.J., Cunha-Rodrigues,M., Ramesar,J., Buscher,P., Que,I., Lowik,C., Voshol,P.J., den Boer,M.A., van Duinen,S.G., Febbraio,M., Mota,M.M., and Waters,A.P. (2005). Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 11468-11473.

Friedl,R., Pichler,I., Spieckermann,P., and Moeslinger,T. (2006). Oxidized phosphatidylcholine but not native phosphatidylcholine inhibits inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci* 78, 1586-1591.

Frosch,M., Strey,A., Vogl,T., Wulffraat,N.M., Kuis,W., Sunderkotter,C., Harms,E., Sorg,C., and Roth,J. (2000). Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 628-637.

Frommhold, D., Mannigel, I., Schymeinsky, J., Mocsai, A., Poeschl, J, Walzog, B., Sperandio, M.(2007). Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo. *BMC Immunol.* 28;8:31.

Fuortes,M., Melchior,M., Han,H., Lyon,G.J., and Nathan,C. (1999). Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF. *J Clin. Invest* 104, 327-335.

Galkina,E. and Ley,K. (2007). Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2292-2301.

Garcia,A.M., Gagne,G.M., Ames,I.H., Stiteler,W., Tomar,R.H., and McAfee,J.G. (1988). Migratory patterns of different indium-111 labeled leukocyte populations (chiefly lymphocytes) from control and thymectomized rats. *J Nucl. Med.* 29, 83-90.

Gargalovic, P.S., Imura, M., Zhang, B., Gharavi, N.M., Clark, M.J., Pagnon, J., Yang, W.P., He, A., Truong, A., Patel, S., Nelson, S.F., Horvath, S., Berliner, J.A., Kirchgessner, T.G., Lusis, A.J.(2006). Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12741–12746.

Gelhaus,A., Scheduling,A., Browne,E., Burchard,G.D., and Horstmann,R.D. (2001). Variability of the CD36 gene in West Africa. *Hum. Mutat.* 18, 444-450.

Gerritsen,M.E. (1996). Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. *Cardiovasc. Res* 32, 720-732.

Gharavi, N.M., Baker, N.A., Mouillisseaux, K.P., Yeung, W., Honda, H.M., Hsieh, X., Yeh, M., Smart, E.J., Berliner, J.A. (2006). Role of endothelial nitric oxide synthase in the regulation of SREBP activation by oxidized phospholipids. *Circ Res* 98: 768–776.

Ghosh, A., Li, W., Febbraio, M., Espinola, R.G., McCrae, K.R., Cockrell, E., and Silverstein, R.L. (2008). Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice. *J. Clin. Invest* 118, 1934–1943.

Glass, C.K. and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104, 503–516.

Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A.B., and Korbonits, M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin. Endocrinol. Metab* 87, 2988.

Gordon, S. and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev. Immunol* 5, 953–964.

Gorlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V.B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R.P., Kietzmann, T., and Busse, R. (2001). Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ. Res* 89, 47–54.

Granger, D.N., Vowinkel, T., and Petnehazy, T. (2004). Modulation of the inflammatory response in cardiovascular disease. *Hypertension* 43, 924–931.

Greaves, D.R. and Gordon, S. (2005). The immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res* 46 (1), 11–20.

Greaves, D.R. and Gordon, S. (2009). The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J Lipid Res* 50 Suppl, S282–S286.

Greenberg, M.E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R., and Hazen, S.L. (2006). Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 203, 2613–2625.

Greenberg, M.E., Li, X.M., Gugi, B.G., Gu, X., Qin, J., Salomon, R.G., and Hazen, S.L. (2008). The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J. Biol. Chem.* 283, 2385–2396.

Greenwald, R.A., Diamond, S.H., and Brain, D.S. (1994). The subcutaneous air pouch model of inflammation. In *Handbook of animal models for the rheumatic diseases*, Elsevier Science & Technology Books, 125–136.

Griffin, E., Re, A., Hamel, N., Fu, C., Bush, H., McCaffrey, T., and Asch, A.S. (2001). A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat. Med.* 7, 840–846.

Grosche,A., Morton,A.J., Polyak,M.M., Matyjaszek,S., and Freeman,D.E. (2008). Detection of calprotectin and its correlation to the accumulation of neutrophils within equine large colon during ischaemia and reperfusion. *Equine Vet. J* 40, 393-399.

Gruarin,P., Thorne,R.F., Dorahy,D.J., Burns,G.F., Sitia,R., and Alessio,M. (2000). CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 446-454.

Grundy,S.M., Cleeman,J.I., Merz,C.N., Brewer,H.B., Jr., Clark,L.T., Hunninghake,D.B., Pasternak,R.C., Smith,S.C., Jr., and Stone,N.J. (2004). Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 110, 227-239.

Gustafsson,M. and Boren,J. (2004). Mechanism of lipoprotein retention by the extracellular matrix. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 505-514.

Guy,E., Kuchibhotla,S., Silverstein,R., and Febbraio,M. (2007). Continued inhibition of atherosclerotic lesion development in long term Western diet fed CD36<sup>0</sup>/apoE<sup>0</sup> mice. *Atherosclerosis* 192, 123-130.

Hakala,J.K., Oorni,K., Pentikainen,M.O., Hurt-Camejo,E., and Kovanen,P.T. (2001). Lipolysis of LDL by human secretory phospholipase A(2) induces particle fusion and enhances the retention of LDL to human aortic proteoglycans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1053-1058.

Hakala,J.K., Oksjoki,R., Laine,P., Du,H., Grabowski,G.A., Kovanen,P.T., and Pentikainen,M.O. (2003). Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1430-1436.

Hallenbeck,J.M., Dutka,A.J., Tanishima,T., Kochanek,P.M., Kumaroo,K.K., Thompson,C.B., Obrenovitch,T.P., and Contreras,T.J. (1986). Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 17, 246-253.

Han,J., Hajjar,D.P., Tauras,J.M., Feng,J., Gotto,A.M., Jr., and Nicholson,A.C. (2000). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J. Biol. Chem.* 275, 1241-1246.

Han,J., Zhou,X., Yokoyama,T., Hajjar,D.P., Gotto,A.M., Jr., and Nicholson,A.C. (2004). Pitavastatin downregulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *Circulation* 109, 790-796.

Harb, D., Bujold, K., Febbraio, M., Sirois, M. G., Tremblay, A., Marleau, S., and Ong, H. (2005a) Les effets anti-athérosclérotiques des Growth Hormone-Releasing Peptides. *Médecine Sciences.* 21. 20.



Harb, D., Bujold, K., Febbraio, M., Sirois, M. G., Tremblay, A., Ong, H., and Marleau, S. (2005b) Growth Hormone-Releasing Peptides: a novel class of anti-atherosclerotic agents. *Inflamm Res* 54, s207.

Harb, D., Bujold, K., Febbraio, M., Sirois, M. G., Ong, H., and Marleau, S. (2009). The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* 83, 42-51.

Harizi, H., Corcuff, J. B., and Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol. Med.* 14, 461-469.

Hatmi, M., Gavaret, J. M., Elalamy, I., Vargaftig, B. B., and Jacquemin, C. (1996). Evidence for cAMP-dependent platelet ectoprotein kinase activity that phosphorylates platelet glycoprotein IV (CD36). *J. Biol. Chem.* 271, 24776-24780.

Hazen, S. L. (2008). Oxidized phospholipids as endogenous pattern recognition ligands in innate immunity. *J. Biol. Chem.* 283, 15527-15531.

Herkert, O., Diebold, I., Brandes, R. P., Hess, J., Busse, R., and Gorlach, A. (2002). NADPH oxidase mediates tissue factor-dependent surface procoagulant activity by thrombin in human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 105, 2030-2036.

Hetland, G., Talgo, G. J., and Fagerhol, M. K. (1998). Chemotaxins C5a and fMLP induce release of calprotectin (leucocyte L1 protein) from polymorphonuclear cells in vitro. *Mol. Pathol.* 51, 143-148.

Hirakata, M., Tozawa, R., Imura, Y., and Sugiyama, Y. (2004). Comparison of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on macrophage foam cell formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 782-788.

Ho, M., Hoang, H. L., Lee, K. M., Liu, N., MacRae, T., Montes, L., Flatt, C. L., Yipp, B. G., Berger, B. J., Looareesuwan, S., and Robbins, S. M. (2005). Ectophosphorylation of CD36 regulates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to microvascular endothelium under flow conditions. *Infect. Immun.* 73, 8179-8187.

Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U., and Beutler, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433, 523-527.

Holland, J. A., Ziegler, L. M., and Meyer, J. W. (1996). Atherogenic levels of low-density lipoprotein increase hydrogen peroxide generation in cultured human endothelial cells: possible mechanism of heightened endocytosis. *J Cell Physiol* 166, 144-151.

Holloway, G. P., Bezaire, V., Heigenhauser, G. J., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Bonen, A., and Spriet, L. L. (2006). Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. *J. Physiol* 571, 201-210.

Holloway,G.P., Thrush,A.B., Heigenhauser,G.J., Tandon,N.N., Dyck,D.J., Bonen,A., and Spriet,L.L. (2007). Skeletal muscle mitochondrial FAT/CD36 content and palmitate oxidation are not decreased in obese women. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 292, E1782-E1789.

Holloway,G.P., Jain,S.S., Bezair,V., Han,X.X., Glatz,J.F., Luiken,J.J., Harper,M.E., and Bonen,A. (2009). FAT/CD36-null mice reveal that mitochondrial FAT/CD36 is required to upregulate mitochondrial fatty acid oxidation in contracting muscle. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 297, R960-R967.

Holvoet, P., Vanhaecke, S., Janssens, F., Van de Werf, Collen, D. (1998). Oxidized LDL and malondialdehyd-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease Oxidized LDL and malondialdehyd-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 98, 1487-1494.

Hong,C. and Tontonoz,P. (2008). Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 461-467.

Horkko,S., Bird,D.A., Miller,E., Itabe,H., Leitinger,N., Subbanagounder,G., Berliner,J.A., Friedman,P., Dennis,E.A., Curtiss,L.K., Palinski,W., and Witztum,J.L. (1999). Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins. *J Clin. Invest* 103, 117-128.

Huang,M.M., Bolen,J.B., Barnwell,J.W., Shattil,S.J., and Brugge,J.S. (1991). Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7844-7848.

Huang,J.T., Welch,J.S., Ricote,M., Binder,C.J., Willson,T.M., Kelly,C., Witztum,J.L., Funk,C.D., Conrad,D., and Glass,C.K. (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400, 378-382.

Huang,H., Campbell,S.C., Bedford,D.F., Nelius,T., Veliceasa,D., Shroff,E.H., Henkin,J., Schneider,A., Bouck,N., and Volpert,O.V. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands improve the antitumor efficacy of thrombospondin peptide ABT510. *Mol. Cancer Res.* 2, 541-550.

Huh,H.Y., Lo,S.K., Yesner,L.M., and Silverstein,R.L. (1995). CD36 induction on human monocytes upon adhesion to tumor necrosis factor-activated endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 6267-6271.

Huh,H.Y., Pearce,S.F., Yesner,L.M., Schindler,J.L., and Silverstein,R.L. (1996). Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood* 87, 2020-2028.

Huo,Y., Hafezi-Moghadam,A., and Ley,K. (2000). Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ. Res* 87, 153-159.

Huo,Y., Schober,A., Forlow,S.B., Smith,D.F., Hyman,M.C., Jung,S., Littman,D.R., Weber,C., and Ley,K. (2003). Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 9, 61-67.

Huo, Y., Xia, L. (2009). P-selectin glycoprotein ligand-1 plays a crucial role in the selective recruitment of leukocytes into the atherosclerotic arterial wall. *Trends Cardiovasc Med.* 19(4):140-5.

Hurt E., Bondjers G., Camejo G. Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived macrophages. (1990). *J Lipid Res* 31, 443-454.

Hwang,E.H., Taki,J., Yasue,S., Fujimoto,M., Taniguchi,M., Matsunari,I., Nakajima,K., Shiobara,S., Ikeda,T., and Tonami,N. (1998). Absent myocardial iodine-123-BMIPP uptake and platelet/monocyte CD36 deficiency. *J Nucl. Med.* 39, 1681-1684.

Iantorno,M., Chen,H., Kim,J.A., Tesauro,M., Lauro,D., Cardillo,C., and Quon,M.J. (2007). Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 292, E756-E764.

Imai,M., Tanaka,T., Kintaka,T., Ikemoto,T., Shimizu,A., and Kitaura,Y. (2002). Genomic heterogeneity of type II CD36 deficiency. *Clin. Chim. Acta* 321, 97-106.

Imhof,B.A. and Aurrand-Lions,M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev. Immunol* 4, 432-444.

Ip,Y.T. and Davis,R.J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol* 10, 205-219.

Iruela-Arispe,M.L., Lombardo,M., Krutzsch,H.C., Lawler,J., and Roberts,D.D. (1999). Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* 100, 1423-1431.

Ishibashi,S., Brown,M.S., Goldstein,J.L., Gerard,R.D., Hammer,R.E., and Herz,J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin. Invest* 92, 883-893.

Ishii, H., Tezuka, T., Ishikawa, H., Takada, K., Oida, K., Horie, S. (2003). Oxidized phospholipids in oxidized low-density lipoprotein down-regulate thrombomodulin transcription in vascular endothelial cells through a decrease in the binding of RARbeta-RXRalpha heterodimers and Sp1 and Sp3 to their binding sequences in the TM promoter. *Blood.* 101: 4765–4774.

Ismail,N.A., Alavi,M.Z., and Moore,S. (1994). Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 105, 79-87.

Jackson, R.L., Busch,S.J., Cardin, A.D. (1991) Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev.* 71(2):481-539.

Janabi,M., Yamashita,S., Hirano,K., Sakai,N., Hiraoka,H., Matsumoto,K., Zhang,Z., Nozaki,S., and Matsuzawa,Y. (2000). Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1953-1960.

Jawień,J., Nastalek,P., and Korbut,R. (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *J. Physiol Pharmacol.* 55, 503-517.

Ji,Y., Jian,B., Wang,N., Sun,Y., Moya,M.L., Phillips,M.C., Rothblat,G.H., Swaney,J.B., and Tall,A.R. (1997). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272, 20982-20985.

Jimenez,B., Volpert,O.V., Crawford,S.E., Febbraio,M., Silverstein,R.L., and Bouck,N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat. Med.* 6, 41-48.

Jimenez,J.J., Jy,W., Mauro,L.M., Soderland,C., Horstman,L.L., and Ahn,Y.S. (2003). Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.* 109, 175-180.

Jimenez-Dalmaroni, M.J., Xiao, N., Corper,A.L., Verdino, P., Ainge, G.D., Larsen, D.S., Painter, G.F., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Hoebe, K., Beutler, B., Wilson, I.A. (2009). Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2. *PLoS One.* 4(10):e7411.

Jochen,A. and Hays,J. (1993). Purification of the major substrate for palmitoylation in rat adipocytes: N-terminal homology with CD36 and evidence for cell surface acylation. *J. Lipid Res.* 34, 1783-1792.

Johnson,J.L. and Jackson,C.L. (2001). Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis* 154, 399-406.

Jordan,J.R., Moore,E.E., Sarin,E.L., Damle,S.S., Kashuk,S.B., Silliman,C.C., and Banerjee,A. (2008). Arachidonic acid in postshock mesenteric lymph induces pulmonary synthesis of leukotriene B4. *J Appl. Physiol* 104, 1161-1166.

Joseph,S.B., McKilligin,E., Pei,L., Watson,M.A., Collins,A.R., Laffitte,B.A., Chen,M., Noh,G., Goodman,J., Hagger,G.N., Tran,J., Tippin,T.K., Wang,X., Lusis,A.J., Hsueh,W.A., Law,R.E., Collins,J.L., Willson,T.M., and Tontonoz,P. (2002). Synthetic

LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 7604-7609.

Kannan,S. (2003). Inflammation: a novel mechanism for the transport of extracellular nucleotide-induced arachidonic acid by S100A8/A9 for transcellular metabolism. *Cell Biol Int.* 27, 593-595.

Kar,N.S., Ashraf,M.Z., Valiyaveetil,M., and Podrez,E.A. (2008). Mapping and characterization of the binding site for specific oxidized phospholipids and oxidized low density lipoprotein of scavenger receptor CD36. *J. Biol. Chem.* 283, 8765-8771.

Karim,S., Habib,A., Levy-Toledano,S., and Maclouf,J. (1996). Cyclooxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *J. Biol. Chem.* 271, 12042-12048.

Kennedy,D.J., Kuchibhotla,S.D., Guy,E., Park,Y.M., Nimako,G., Vanegas,D., Morton,R.E., and Febbraio,M. (2009). Dietary cholesterol plays a role in CD36-mediated atherogenesis in LDLR-knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1481-1487.

Kerkhoff,C., Klempt,M., Kaefer,V., and Sorg,C. (1999). The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 274, 32672-32679.

Kerkhoff,C., Sorg,C., Tandon,N.N., and Nacken,W. (2001). Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells. *Biochemistry* 40, 241-248.

Kerkhoff,C., Nacken,W., Benedyk,M., Dagher,M.C., Sopalla,C., and Doussiere,J. (2005). The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *FASEB J.* 19, 467-469.

Khadaroo,R.G., Kapus,A., Powers,K.A., Cybulsky,M.I., Marshall,J.C., and Rotstein,O.D. (2003). Oxidative stress reprograms lipopolysaccharide signaling via Src kinase-dependent pathway in RAW 264.7 macrophage cell line. *J Biol Chem.* 278, 47834-47841.

Khandoga,A., Huettinger,S., Khandoga,A.G., Li,H., Butz,S., Jauch,K.W., Vestweber,D., and Krombach,F. (2009). Leukocyte transmigration in inflamed liver: A role for endothelial cell-selective adhesion molecule. *J Hepatol.* 50, 755-765.

Kharbanda,S., Saleem,A., Yuan,Z., Emoto,Y., Prasad,K.V., and Kufe,D. (1995). Stimulation of human monocytes with macrophage colony-stimulating factor induces a Grb2-mediated association of the focal adhesion kinase pp125FAK and dynamin. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 92, 6132-6136.

- Kieffer,N., Nurden,A.T., Hasitz,M., Titeux,M., and Breton-Gorius,J. (1988). Identification of platelet membrane thrombospondin binding molecules using an anti-thrombospondin antibody. *Biochim. Biophys. Acta* 967, 408-415.
- Kim,E., Tolhurst,A.T., Qin,L.Y., Chen,X.Y., Febbraio,M., and Cho,S. (2008). CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury. *J. Neurosci.* 28, 4661-4670.
- Kinlay,S., Libby,P., and Ganz,P. (2001). Endothelial function and coronary artery disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 383-389.
- Kircher,M.F., Grimm,J., Swirski,F.K., Libby,P., Gerszten,R.E., Allport,J.R., and Weissleder,R. (2008). Noninvasive in vivo imaging of monocyte trafficking to atherosclerotic lesions. *Circulation* 117, 388-395.
- Kiss,A.L., Turi,A., Muller,N., Kantor,O., and Botos,E. (2002). Caveolae and caveolin isoforms in rat peritoneal macrophages. *Micron* 33, 75-93.
- Klopotek,A., Hirche,F., and Eder,K. (2006). PPAR gamma ligand troglitazone lowers cholesterol synthesis in HepG2 and Caco-2 cells via a reduced concentration of nuclear SREBP-2. *Exp. Biol. Med.* 231, 1365-1372.
- Klouche,M., Rose-John, S., Schmiedt,W., Bhakdi,S. (2000). Enzymatically degraded. non oxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation.* 101:1799-1805.
- Kochanek,P.M. and Hallenbeck,J.M. (1992). Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 23, 1367-1379.
- Kolak,M., Yki-Jarvinen,H., Kannisto,K., Tiikkainen,M., Hamsten,A., Eriksson,P., and Fisher,R.M. (2007). Effects of chronic rosiglitazone therapy on gene expression in human adipose tissue in vivo in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 92, 720-724.
- Koonen,D.P., Glatz,J.F., Bonen,A., and Luiken,J.J. (2005). Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1736, 163-180.
- Korporaal,S.J., Van,E.M., Adelmeijer,J., Ijsseldijk,M., Out,R., Lisman,T., Lenting,P.J., Van Berkel,T.J., and Akkerman,J.W. (2007). Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2476-2483.
- Krischer, S.M., Eisenmann, M., Meike, S.M., MuellerR, M.J. (1998) Transport of Arachidonic Acid across the Neutrophil Plasma Membrane via a Protein-Facilitated Mechanism. *Biochemistry.* 37 (37), 12884-12891.

Kuang,M., Febbraio,M., Wagg,C., Lopaschuk,G.D., and Dyck,J.R. (2004). Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia. *Circulation* 109, 1550-1557.

Kuchibhotla,S., Vanegas,D., Kennedy,D.J., Guy,E., Nimako,G., Morton,R.E., and Febbraio,M. (2008). Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc. Res.* 78, 185-196.

Kumagai,N., Ohno,K., Tameshige,R., Hoshijima,M., Yogo,K., Ishida,N., and Takeya,T. (2004). Induction of mouse c-src in RAW264 cells is dependent on AP-1 and NF-kappaB and important for progression to multinucleated cell formation. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 325, 758-768.

Kume,A., Nishiura,H., Suda,J., and Suda,T. (1997). Focal adhesion kinase upregulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not by interleukin-3 in differentiating myeloid cells. *Blood* 89, 3434-3442.

Kunjathoor,V.V., Febbraio,M., Podrez,E.A., Moore,K.J., Andersson,L., Koehn,S., Rhee,J.S., Silverstein,R., Hoff,H.F., and Freeman,M.W. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J. Biol. Chem.* 277, 49982-49988.

Kunz,A., Abe,T., Hochrainer,K., Shimamura,M., Anrather,J., Racchumi,G., Zhou,P., and Iadecola,C. (2008). Nuclear factor-kappaB activation and postischemic inflammation are suppressed in CD36-null mice after middle cerebral artery occlusion. *J. Neurosci.* 28, 1649-1658.

Kyriakis,J.M. and Avruch,J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81, 807-869.

Laugerette,F., Passilly-Degrace,P., Patris,B., Niot,I., Febbraio,M., Montmayeur,J.P., and Besnard,P. (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J. Clin. Invest* 115, 3177-3184.

Lee,K., Godeau,B., Fromont,P., Plonquet,A., Debili,N., Bachir,D., Reviron,D., Gourin,J., Fernandez,E., Galacteros,F., and Bierling,P. (1999). CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. *Transfusion* 39, 873-879.

Lefer,A.M., Ma,X.L., Weyrich,A., and Lefer,D.J. (1993). Endothelial dysfunction and neutrophil adherence as critical events in the development of reperfusion injury. *Agents Actions Suppl* 41, 127-135.

Lehr,H.A., Menger,M.D., and Messmer,K. (1993). Impact of leukocyte adhesion on myocardial ischemia/reperfusion injury: conceivable mechanisms and proven facts. *J Lab Clin. Med.* 121, 539-545.

Leitinger,N. (2003). Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* *14*, 421-430.

Leitinger,N. (2005). Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food Res.* *49*, 1063-1071.

Lepretre,F., Linton,K.J., Lacquemant,C., Vatin,V., Samson,C., Dina,C., Chikri,M., Ali,S., Scherer,P., Seron,K., Vasseur,F., Aitman,T., and Froguel,P. (2004a). Genetic study of the CD36 gene in a French diabetic population. *Diabetes Metab* *30*, 459-463.

Lepretre,F., Vasseur,F., Vaxillaire,M., Scherer,P.E., Ali,S., Linton,K., Aitman,T., and Froguel,P. (2004b). A CD36 nonsense mutation associated with insulin resistance and familial type 2 diabetes. *Hum. Mutat.* *24*, 104.

Levy,E., Spahis,S., Sinnett,D., Peretti,N., Maupas-Schwalm,F., Delvin,E., Lambert,M., and Lavoie,M.A. (2007). Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr. Opin. Lipidol.* *18*, 310-318.

Ley,K., Laudanna,C., Cybulsky,M.I., and Nourshargh,S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 678-689.

Li T and Chiang J. (2009) Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR Res.* *2009*, 501739.

Li,X., Hunter,D., Morris,J., Haskill,J.S., and Earp,H.S. (1998). A calcium-dependent tyrosine kinase splice variant in human monocytes. Activation by a two-stage process involving adherence and a subsequent intracellular signal. *J Biol Chem.* *273*, 9361-9364.

Li,L. and Frei,B. (2006). Iron chelation inhibits NF-kappaB-mediated adhesion molecule expression by inhibiting p22(phox) protein expression and NADPH oxidase activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 2638-2643.

Li,W., Febbraio, M., Reddy, S.P., Yu, D.Y., Yamamoto, M., Silverstein, R.L.(2010). CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs. *J Clin Invest.* *120*(11):3996–4006.

Liang,C.P., Han,S., Okamoto,H., Carnemolla,R., Tabas,I., Accili,D., and Tall,A.R. (2004). Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J. Clin. Invest* *113*, 764-773.

Libby,P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* *420*, 868-874.

Libby,P. (2005). The Forgotten Majority. Unfinished Business in Cardiovascular Risk Reduction. *J Am Coll Cardiol.* *46*:1225– 8.

Lichtman,A.H., Clinton,S.K., Iiyama,K., Connelly,P.W., Libby,P., and Cybulsky,M.I. (1999). Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-



deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1938-1944.

Lim,H.J., Lee,S., Lee,K.S., Park,J.H., Jang,Y., Lee,E.J., and Park,H.Y. (2006). PPARgamma activation induces CD36 expression and stimulates foam cell like changes in rVSMCs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 80, 165-174.

Lin,T.H., Yurochko,A., Kornberg,L., Morris,J., Walker,J.J., Haskill,S., and Juliano,R.L. (1994). The role of protein tyrosine phosphorylation in integrin-mediated gene induction in monocytes. *J Cell Biol* 126, 1585-1593.

Lipsky,R.H., Eckert,D.M., Tang,Y., and Ockenhouse,C.F. (1997). The carboxyl-terminal cytoplasmic domain of CD36 is required for oxidized low-density lipoprotein modulation of NF-kappaB activity by tumor necrosis factor-alpha. *Recept. Signal. Transduct.* 7, 1-11.

Llaverias,G., Rebollo,A., Pou,J., Vazquez-Carrera,M., Sanchez,R.M., Laguna,J.C., and Alegret,M. (2006). Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. *Biochem. Pharmacol.* 71, 605-614.

Llodra,J., Angeli,V., Liu,J., Trogan,E., Fisher,E.A., and Randolph,G.J. (2004). Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 101, 11779-11784.

Locatelli,V., Rossoni,G., Schweiger,F., Torsello,A., De,G.C., V, Bernareggi,M., Deghenghi,R., Muller,E.E., and Berti,F. (1999). Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology* 140, 4024-4031.

Lougheed,M. and Steinbrecher,U.P. (1996). Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J Biol Chem.* 271, 11798-11805.

Luangrath,V., Brodeur,M.R., Rhainds,D., and Brissette,L. (2008). Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1290-1295.

Luiken,J.J., Willems,J., Van der Vusse,G.J., and Glatz,J.F. (2001). Electrostimulation enhances FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake by isolated rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 281, E704-E712.

Luiken,J.J., Dyck,D.J., Han,X.X., Tandon,N.N., Arumugam,Y., Glatz,J.F., and Bonen,A. (2002a). Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 282, E491-E495.

Luiken, J.J., Koonen, D.P., Willems, J., Zorzano, A., Becker, C., Fischer, Y., Tandon, N.N., Van der Vusse, G.J., Bonen, A., and Glatz, J.F. (2002b). Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes* 51, 3113-3119.

Luiken, J.J., Coort, S.L., Willems, J., Coumans, W.A., Bonen, A., Van der Vusse, G.J., and Glatz, J.F. (2003). Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* 52, 1627-1634.

Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.

Luster, A.D., Alon, R., and von Andrian, U.H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6, 1182-1190.

Mackay J and Mensah G. Atlas of Heart Disease and Stroke. World Health Organization. Geneva. 2004.

Makoveichuk E, Lookene A, Olivecrona G. Mild oxidation of lipoproteins increases their affinity for surfaces covered by heparan sulfate and LPL (1998). *Biochem Biophys Res Commun* 252:703-710

Malaud, E., Hourton, D., Giroux, L.M., Ninio, E., Buckland, R., and McGregor, J.L. (2002). The terminal six amino-acids of the carboxy cytoplasmic tail of CD36 contain a functional domain implicated in the binding and capture of oxidized low-density lipoprotein. *Biochem. J.* 364, 507-515.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.

Mantovani, A., Garlanda, C., and Locati, M. (2009). Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1419-1423.

Marleau, S., Griffiths-Johnson, D.A., Collins, P.D., Bakhle, Y.S., Williams, T.J., and Jose, P.J. (1996). Human RANTES acts as a receptor antagonist for guinea pig eotaxin in vitro and in vivo. *J Immunol* 157, 4141-4146.

Marleau, S., Fruteau de Laclos, B., Sanchez, A.B., Poubelle, P.E., and Borgeat, P. (1999). Role of 5-lipoxygenase products in the local accumulation of neutrophils in dermal inflammation in the rabbit. *J Immunol* 163, 3349-3458.

Marleau, S., Harb, D., Bujold, K., Avallone, R., Iken, K., Wang, Y., Demers, A., Sirois, M.G., Febbraio, M., Silverstein, R.L., Tremblay, A., and Ong, H. (2005). EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J.* 19, 1869-1871.

- Marleau,S., Mulumba,M., Lamontagne,D., and Ong,H. (2006). Cardiac and peripheral actions of growth hormone and its releasing peptides: relevance for the treatment of cardiomyopathies. *Cardiovasc. Res* 69, 26-35.
- Marzi,I., Takei,Y., Knee,J., Menger,M., Gores,G.J., Buhren,V., Trentz,O., Lemasters,J.J., and Thurman,R.G. (1990). Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat. *Transplant. Proc.* 22, 2004-2005.
- McAfee,J.G. and Thakur,M.L. (1976). Survey of radioactive agents for in vitro labeling of phagocytic leukocytes. I. Soluble agents. *J Nucl. Med.* 17, 480-487.
- McAfee,J.G., Subramanian,G., and Gagne,G. (1984). Technique of leukocyte harvesting and labeling: problems and perspectives. *Semin. Nucl. Med.* 14, 83-106.
- Means,T.K., Mylonakis,E., Tampakakis,E., Colvin,R.A., Seung,E., Puckett,L., Tai,M.F., Stewart,C.R., Pukkila-Worley,R., Hickman,S.E., Moore,K.J., Calderwood,S.B., Hacohen,N., Luster,A.D., and El,K.J. (2009). Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J. Exp. Med.* 206, 637-653.
- Medeiros,L.A., Khan,T., El Khoury,J.B., Pham,C.L., Hatters,D.M., Howlett,G.J., Lopez,R., O'Brien,K.D., and Moore,K.J. (2004). Fibrillar amyloid protein present in atheroma activates CD36 signal transduction. *J. Biol. Chem.* 279, 10643-10648.
- Meir,K.S. and Leitersdorf,E. (2004). Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1006-1014.
- Mestas,J. and Ley,K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 18, 228-232.
- Meyer,J.W. and Schmitt,M.E. (2000). A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Lett.* 472, 1-4.
- Miao,W.M., Vasile,E., Lane,W.S., and Lawler,J. (2001). CD36 associates with CD9 and integrins on human blood platelets. *Blood* 97, 1689-1696.
- Miksa,M., Wu,R., Cui,X., Dong,W., Das,P., Simms,H.H., Ravikumar,T.S., and Wang,P. (2007). Vasoactive hormone adrenomedullin and its binding protein: anti-inflammatory effects by up-regulating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Immunol.* 179, 6263-6272.
- Miller,Y.I., Worrall,D.S., Funk,C.D., Feramisco,J.R., and Witztum,J.L. (2003). Actin polymerization in macrophages in response to oxidized LDL and apoptotic cells: role of 12/15-lipoxygenase and phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Biol Cell* 14, 4196-4206.
- Mine,S., Tabata,T., Wada,Y., Fujisaki,T., Iida,T., Noguchi,N., Niki,E., Kodama,T., and Tanaka,Y. (2002). Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion

and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway. *Atherosclerosis* 160, 281-288.

Mitra,S.K., Hanson,D.A., and Schlaepfer,D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 56-68.

Monick,M.M., Powers,L., Butler,N., Yarovinsky,T., and Hunninghake,G.W. (2002). Interaction of matrix with integrin receptors is required for optimal LPS-induced MAP kinase activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 283, L390-L402.

Moniuszko,M., Kowal,K., Rusak,M., Pietruczuk,M., Dabrowska,M., and Bodzenta-Lukaszyk,A. (2006). Monocyte CD163 and CD36 expression in human whole blood and isolated mononuclear cell samples: influence of different anticoagulants. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 704-707.

Moore,K.J., El,K.J., Medeiros,L.A., Terada,K., Geula,C., Luster,A.D., and Freeman,M.W. (2002). A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 277, 47373-47379.

Moore,K.J., Kunjathoor,V.V., Koehn,S.L., Manning,J.J., Tseng,A.A., Silver,J.M., McKee,M., and Freeman,M.W. (2005). Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *J. Clin. Invest* 115, 2192-2201.

Moore,K.J. and Freeman,M.W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1702-1711.

Morozova,S., Suc-Royer,I., and Auwerx,J. (2004). Cholesterol metabolism modulators and the future of atherosclerosis therapy. *Med. Sci. (Paris)* 20, 685-690.

Mosser,D.M. and Edwards,J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev. Immunol* 8, 958-969.

Mwaikambo,B.R., Sennlaub,F., Ong,H., Chemtob,S., and Hardy,P. (2006). Activation of CD36 inhibits and induces regression of inflammatory corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4356-4364.

Mwaikambo,B.R., Yang,C., Ong,H., Chemtob,S., and Hardy,P. (2008). Emerging roles for the CD36 scavenger receptor as a potential therapeutic target for corneal neovascularization. *Endocr. Metab Immune. Disord. Drug Targets.* 8, 255-272.

Nacken,W., Roth,J., Sorg,C., and Kerkhoff,C. (2003). S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microsc. Res Tech.* 60, 569-580.

Nagy,L., Tontonoz,P., Alvarez,J.G., Chen,H., and Evans,R.M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93, 229-240.

Naik,S.U., Wang,X., Da Silva, J.S., Jaye, M., Macphee, C.H., Reilly, M.P., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., Rader, D.J.(2006). Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. *113*(1):90-7.

Nakamura,I., Kadono,Y., Takayanagi,H., Jimi,E., Miyazaki,T., Oda,H., Nakamura,K., Tanaka,S., Rodan,G.A., and Duong,I.T. (2002). IL-1 regulates cytoskeletal organization in osteoclasts via TNF receptor-associated factor 6/c-Src complex. *J Immunol*. *168*, 5103-5109.

Nakashima,Y., Plump,A.S., Raines,E.W., Breslow,J.L., and Ross,R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb*. *14*, 133-140.

Nakashima,Y., Wight,T.N., and Sueishi,K. (2008). Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc. Res*. *79*, 14-23.

Natarajan,V., Scribner,W.M., al-Hassani,M., and Vepa,S. (1998). Reactive oxygen species signaling through regulation of protein tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Environ. Health Perspect*. *106 Suppl 5*, 1205-1212.

Nicholls,S.J. and Hazen,S.L. (2009). Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *J. Lipid Res*. *50 Suppl*, S346-S351.

Nicholson,A.C., Frieda,S., Pearce,A., and Silverstein,R.L. (1995). Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. *15*, 269-275.

Nicholson,A.C., Febbraio,M., Han,J., Silverstein,R.L., and Hajjar,D.P. (2000). CD36 in atherosclerosis. The role of a class B macrophage scavenger receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. *902*, 128-131.

Nicholson,A.C. (2004). Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling. *Trends Cardiovasc. Med*. *14*, 8-12.

Nilsen,N.J., Deininger,S., Nonstad,U., Skjeldal,F., Husebye,H., Rodionov,D., von,A.S., Hartung,T., Lien,E., Bakke,O., and Espevik,T. (2008). Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling: role of CD14 and CD36. *J. Leukoc. Biol*. *84*, 280-291.

Noiri,E., Yokomizo,T., Nakao,A., Izumi,T., Fujita,T., Kimura,S., and Shimizu,T. (2000). An in vivo approach showing the chemotactic activity of leukotriene B(4) in acute renal ischemic-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *97*, 823-828.

Nourshargh, S., Hordijk, P.L., Sixt, M., Tannock, L.R., Chait, A. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. (2010). *Nat Rev Mol Cell Biol*. *11*(5):366-78.

- Nozaki,S., Kashiwagi,H., Yamashita,S., Nakagawa,T., Kostner,B., Tomiyama,Y., Nakata,A., Ishigami,M., Miyagawa,J., Kameda-Takemura,K., and . (1995). Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J. Clin. Invest* 96, 1859-1865.
- O'Donnell,R.W., Johnson,D.K., Ziegler,L.M., DiMattina,A.J., Stone,R.I., and Holland,J.A. (2003). Endothelial NADPH oxidase: mechanism of activation by low-density lipoprotein. *Endothelium* 10, 291-297.
- Obrenovitch,T.P., Kumaroo,K.K., and Hallenbeck,J.M. (1984). Autoradiographic detections of <sup>111</sup>indium-labeled platelets in brain tissue sections. *Stroke* 15, 1049-1056.
- Ohgami,N., Nagai,R., Ikemoto,M., Arai,H., Kuniyasu,A., Horiuchi,S., and Nakayama,H. (2001). CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 947, 350-355.
- Ohkawa,H., Ohishi,N., and Yagi,K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Okigaki,M., Davis,C., Falasca,I., Harroch,S., Felsenfeld,D.P., Sheetz,M.P., and Schlessinger,J. (2003). Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10740-10745.
- Ohkura, N., Hiraishi, S., Itabe, H., Hamuro, T., Kamikubo, Y., Takano, T., Matsuda, J., Horie, S. (2004). Oxidized phospholipids in oxidized low-density lipoprotein reduce the activity of tissue factor pathway inhibitor through association with its carboxy-terminal region. *Antioxid Redox Signal.* 6: 705–712.
- Ong,H., McNicoll,N., Escher,E., Collu,R., Deghenghi,R., Locatelli,V., Ghigo,E., Muccioli,G., Boghen,M., and Nilsson,M. (1998). Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling. *Endocrinology* 139, 432-435.
- Oorni,K., Pentikainen,M.O., Ala-Korpela,M., and Kovanen,P.T. (2000). Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J. Lipid Res.* 41, 1703-1714.
- Oquendo,P., Hundt,E., Lawler,J., and Seed,B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58, 95-101.
- Østerud,B. and Bjorklid,E. (2003). Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 83, 1069-1112.
- Packard,R.R. and Libby,P. (2008). Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin. Chem.* 54, 24-38.
- Packard,R.R., Lichtman,A.H., and Libby,P. (2009). Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin. Immunopathol.* 31, 5-22.

- Park,Y.M., Febbraio,M., and Silverstein,R.L. (2009). CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J. Clin. Invest* 119, 136-145.
- Pearce,S.F., Roy,P., Nicholson,A.C., Hajjar,D.P., Febbraio,M., and Silverstein,R.L. (1998). Recombinant glutathione S-transferase/CD36 fusion proteins define an oxidized low density lipoprotein-binding domain. *J. Biol. Chem.* 273, 34875-34881.
- Pegorier, S., Stengel, D., Durand, H., Croset, M., Ninio, E. (2006). Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages. Implications in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 188: 433–443.
- Pentikäinen, M.O., Oksjoki, R., Oörni, K., Kovanen, P.T. (2002). Lipoprotein lipase in the arterial wall: linking LDL to the arterial extracellular matrix and much more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(2):211-7.
- Philips,J.A., Rubin,E.J., and Perrimon,N. (2005). Drosophila RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science* 309, 1251-1253.
- Plump,A.S. and Breslow,J.L. (1995). Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu. Rev. Nutr.* 15, 495-518.
- Plump,A.S., Smith,J.D., Hayek,T., Aalto-Setälä,K., Walsh,A., Verstuyft,J.G., Rubin,E.M., and Breslow,J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.
- Podrez,E.A., Febbraio,M., Sheibani,N., Schmitt,D., Silverstein,R.L., Hajjar,D.P., Cohen,P.A., Frazier,W.A., Hoff,H.F., and Hazen,S.L. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J. Clin. Invest* 105, 1095-1108.
- Podrez,E.A., Poliakov,E., Shen,Z., Zhang,R., Deng,Y., Sun,M., Finton,P.J., Shan,L., Febbraio,M., Hajjar,D.P., Silverstein,R.L., Hoff,H.F., Salomon,R.G., and Hazen,S.L. (2002a). A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J. Biol. Chem.* 277, 38517-38523.
- Podrez,E.A., Poliakov,E., Shen,Z.Z., Zhang,R.L., Deng,Y.J., Sun,M.J., Finton,P.J., Shan,L., Gugiu,B., Fox,P.L., Hoff,H.F., Salomon,R.G., and Hazen,S.L. (2002b). Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 277, 38503-38516.
- Podrez,E.A., Byzova,T.V., Febbraio,M., Salomon,R.G., Ma,Y., Valiyaveetil,M., Poliakov,E., Sun,M., Finton,P.J., Curtis,B.R., Chen,J., Zhang,R., Silverstein,R.L., and Hazen,S.L. (2007). Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat. Med.* 13, 1086-1095.

- Pohl,J., Ring,A., Korkmaz,U., Ehehalt,R., and Stremmel,W. (2005). FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Mol. Biol. Cell* 16, 24-31.
- Poincloux,R., Vincent,C., Labrousse,A., Castandet,J., Rigo,M., Cougoule,C., Bordier,C., Le,C., V, and Maridonneau-Parini,I. (2006). Re-arrangements of podosome structures are observed when Hck is activated in myeloid cells. *Eur. J Cell Biol* 85, 327-332.
- Poli,G., Sottero,B., Gargiulo,S., and Leonarduzzi,G. (2009). Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Mol. Aspects Med.* 30, 180-189.
- Post,S., Palma,P., Gonzalez,A.P., Rentsch,M., Otto,G., and Menger,M.D. (1993). Role of eicosanoids in reperfusion injury in rat liver transplantation. *Transplant. Proc.* 25, 2547.
- Postler,E., Lehr,A., Schluesener,H., and Meyermann,R. (1997). Expression of the S-100 proteins MRP-8 and -14 in ischemic brain lesions. *Glia* 19, 27-34.
- Powell-Braxton,L., Veniant,M., Latvala,R.D., Hirano,K.I., Won,W.B., Ross,J., Dybdal,N., Zlot,C.H., Young,S.G., and Davidson,N.O. (1998). A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet. *Nat Med.* 4, 934-938.
- Prieto,J., Eklund,A., and Patarroyo,M. (1994). Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell Immunol.* 156, 191-211.
- Primo,L., Ferrandi,C., Roca,C., Marchio,S., di,B.L., Alessio,M., and Bussolino,F. (2005). Identification of CD36 molecular features required for its in vitro angiostatic activity. *FASEB J.* 19, 1713-1715.
- Puccetti,L., Sawamura,T., Pasqui,A.L., Pastorelli,M., Auteri,A., and Bruni,F. (2005). Atorvastatin reduces platelet-oxidized-LDL receptor expression in hypercholesterolaemic patients. *Eur. J. Clin. Invest* 35, 47-51.
- Puente Navazo,M.D., Daviet,L., Ninio,E., and McGregor,J.L. (1996). Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 1033-1039.
- Quinn,M.T., Parthasarathy,S., Fong,L.G., and Steinberg,D. (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2995-2998.
- Rac,M.E., Safranow,K., and Poncyljusz,W. (2007). Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol. Med.* 13, 288-296.



Rahaman,S.O., Lennon,D.J., Febbraio,M., Podrez,E.A., Hazen,S.L., and Silverstein,R.L. (2006). A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 4, 211-221.

Rahaman, S.O., Swat, W., Febbraio, M., Silverstein, R.L. (2011). Vav family Rho guanine nucleotide exchange factors regulate CD36-mediated macrophage foam cell formation *J Biol Chem*. 286(9):7010-7017.

Ralph,P., Moore,M.A., and Nilsson,K. (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp. Med*. 143, 1528-1533.

Rammes,A., Roth,J., Goebeler,M., Klempt,M., Hartmann,M., and Sorg,C. (1997). Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J. Biol. Chem*. 272, 9496-9502.

Ramprasad,M.P., Terpstra,V., Kondratenko,N., Quehenberger,O., and Steinberg,D. (1996). Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14833-14838.

Rector,C.L. and Murphy,R.C. (2009). Determination of Leukotriene A4 stabilization by S100A8/A9 proteins Using Mass spectrometry. *J. Lipid Res*. 50(10):2064-71.

Reddick,R.L., Zhang,S.H., and Maeda,N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 14, 141-147.

Ricote,M., Li,A.C., Willson,T.M., Kelly,C.J., and Glass,C.K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82.

Ricote,M., Valledor,A.F., and Glass,C.K. (2004). Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 24, 230-239.

Ring,A., Le,L.S., Pohl,J., Verkade,P., and Stremmel,W. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 416-423.

Robinson,M.J., Tessier,P., Poulsom,R., and Hogg,N. (2002). The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem*. 277, 3658-3665.

Rosen,H. and Gordon,S. (1990). Adoptive transfer of fluorescence-labeled cells shows that resident peritoneal macrophages are able to migrate into specialized lymphoid organs and inflammatory sites in the mouse. *Eur J Immunol* 20, 1251-1258.

Rosenfeld,M.E., Polinsky,P., Virmani,R., Kauser,K., Rubanyi,G., and Schwartz,S.M. (2000). Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2587-2592.

Ross,R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126.

Rossi,A., Cuzzocrea,S., and Sautebin,L. (2009). Involvement of leukotriene pathway in the pathogenesis of ischemia-reperfusion injury and septic and non-septic shock. *Curr. Vasc Pharmacol.* 7, 185-197.

Rossoni,G., Sala,A., Berti,F., Testa,T., Buccellati,C., Molta,C., Muller-Peddinghaus,R., Macclouf,J., and Folco,G.C. (1996). Myocardial protection by the leukotriene synthesis inhibitor BAY X1005: importance of transcellular biosynthesis of cysteinyl-leukotrienes. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 335-341.

Rot,A., von Andrian,U.H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 22:891-928.

Rouabhia,M., Jobin,N., Doucet,R., Jr., Bergeron,J., and Auger,F.A. (1994). CD36(+)-dendritic epidermal cells: a putative actor in the cutaneous immune system. *Cell Transplant.* 3, 529-536.

Rouhanizadeh, M., Hwang, J., Clempus, R.E., Marcu, L., Lassegue, B., Sevanian, A., Hsiai, T.K. (2005). Oxidized-1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine induces vascular endothelial superoxide production: Implication of NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med.* 39: 1512–1522.

Rovida,E., Lugli,B., Barbetti,V., Giuntoli,S., Olivotto,M., and Dello,S.P. (2005). Focal adhesion kinase is redistributed to focal complexes and mediates cell spreading in macrophages in response to M-CSF. *Biol Chem.* 386, 919-929.

Rubic,T. and Lorenz,R.L. (2006). Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc. Res.* 69, 527-535.

Ryeom,S.W., Sparrow,J.R., and Silverstein,R.L. (1996). CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J. Cell Sci.* 109 (*Pt* 2), 387-395.

Sacca,L., Cittadini,A., and Fazio,S. (1994). Growth hormone and the heart. *Endocr. Rev.* 15, 555-573.

Saha,P., Modarai,B., Humphries,J., Mattock,K., Waltham,M., Burnand,K.G., and Smith,A. (2009). The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 109-118.

Sala,A., Aliev,G.M., Rossoni,G., Berti,F., Buccellati,C., Burnstock,G., Folco,G., and Macclouf,J. (1996). Morphological and functional changes of coronary vasculature caused by transcellular biosynthesis of sulfidopeptide leukotrienes in isolated heart of rabbit. *Blood* 87, 1824-1832.

Salah-Uddin,H., Gordon,M.J., Ford,I., Tandon,N.N., Greaves,M., and Duttaroy,A.K. (2002). Surface expression of fatty acid translocase (FAT/CD36) on platelets in myeloproliferative disorders and non-insulin dependent diabetes mellitus: effect on arachidonic acid uptake. *Mol. Cell Biochem.* 239, 203-211.

Salas,A., Shimaoka, M., Kogan, A.N., Harwood, C., von Andrian, U.H., Springer, T.A. (2004). Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity.* 20(4):393-406.

Sampson,M.J., Davies,I.R., Braschi,S., Ivory,K., and Hughes,D.A. (2003). Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 167, 129-134.

Sanchez-Madrid,F. and del Pozo,M.A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 18, 501-511.

Sato,O., Kuriki,C., Fukui, Y., Motojima, K. (2002). Dual Promoter Structure of Mouse and Human Fatty Acid Translocase/CD36 Genes and Unique Transcriptional Activation by Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha and gamma Ligands. *J. Biol. Chem.* 277:15703-15711.

Sato,O., Takanashi,N., Motojima, K. (2007).Third promoter and differential regulation of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 299:37-43.

Savill,J., Hogg,N., Ren,Y., and Haslett,C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Invest* 90, 1513-1522.

Sawamura,T., Kume,N., Aoyama,T., Moriwaki,H., Hoshikawa,H., Aiba,Y., Tanaka,T., Miwa,S., Katsura,Y., Kita,T., and Masaki,T. (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386, 73-77.

Schenkel,A.R., Mamdouh,Z., and Muller,W.A. (2004). Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol* 5, 393-400.

Schenk,S. and Horowitz,J.F. (2006). Coimmunoprecipitation of FAT/CD36 and CPT I in skeletal muscle increases proportionally with fat oxidation after endurance exercise training. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 291, E254-E260.

Schwenke,D.C. and Carew,T.E. (1989). Initiation of atherosclerotic lesion in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis* 9: 908-918.

Schwenk, R.W., Luiken, J.J., Bonen, A., Glatz, J.F. (2008). Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 79(2):249-58.

Sedgwick, A.D., Sin, Y.M., Edwards, J.C., and Willoughby, D.A. (1983). Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. *J Pathol.* 141, 483-495.

Sedgwick, A.D. and Lees, P. (1986). Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. *Agents Actions* 18, 429-438.

Shalit, F., Sredni, B., Rosenblatt-Bin, H., Kazimirsky, G., Brodie, C., and Huberman, M. (1997). Beta-amyloid peptide induces tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in murine macrophage cultures. *Neuroreport* 8, 3577-3580.

Schaller, M.D. (2010). Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci.* 123 (Pt 7):1007-13.

Shashkin, P., Dragulev, B., and Ley, K. (2005). Macrophage differentiation to foam cells. *Curr. Pharm. Des* 11, 3061-3072.

Shaw, D.R. and Griffin, F.M., Jr. (1982). Thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages are less efficient than resident macrophages in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 128, 433-440.

Shaw, P.X., Horkko, S., Tsimikas, S., Chang, M.K., Palinski, W., Silverman, G.J., Chen, P.P., and Witztum, J.L. (2001). Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1333-1339.

Sheikine, Y. and Hansson, G.K. (2004). Chemokines and atherosclerosis. *Ann Med* 36, 98-118.

Shih, P.T., Elices, M.J., Fang, Z.T., Ugarova, T.P., Strahl, D., Territo, M.C., Frank, J.S., Kovach, N.L., Cabanas, C., Berliner, J.A., Vora, D.K. (1999). Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating beta1 integrin. *J Clin Invest.* 103:613-625.

Shimada, K. (2009). Immune system and atherosclerotic disease: heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. J* 73, 994-1001.

Silverstein, R.L. and Febbraio, M. (2000). CD36 and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 483-491.

Silverstein, R.L. and Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.* 2, re3.

Silverstein,R.L. (2009). Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve. Clin. J. Med.* 76 *Suppl 2*, S27-S30.

Silverstein,R.L., Li ,W., Park, Y.M., Rahaman, S.O.(2010). Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 121:206-20.

Simantov,R. and Silverstein,R.L. (2003). CD36: a critical anti-angiogenic receptor. *Front Biosci.* 8, s874-s882.

Simantov,R., Febbraio,M., and Silverstein,R.L. (2005). The antiangiogenic effect of thrombospondin-2 is mediated by CD36 and modulated by histidine-rich glycoprotein. *Matrix Biol.* 24, 27-34.

Smith,J., Su,X., El-Maghrabi,R., Stahl,P.D., and Abumrad,N.A. (2008). Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J. Biol. Chem.* 283, 13578-13585.

Smith,T.G., Serghides,L., Patel,S.N., Febbraio,M., Silverstein,R.L., and Kain,K.C. (2003). CD36-mediated nonopsonic phagocytosis of erythrocytes infected with stage I and IIA gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 71, 393-400.

Soehnlein,O. and Weber,C. (2009). Myeloid cells in atherosclerosis: initiators and decision shapers. *Semin. Immunopathol.* 31, 35-47.

Sperandio, M., Gleissner, C.A., Ley, K. (2009). Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol Rev.* 230(1):97-113.

Spitaler,M.M. and Graier,W.F. (2002). Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia* 45, 476-494.

Steinberg,D. (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res* 50, S376-S381.

Stern,M., Savill,J., and Haslett,C. (1996). Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis - Mediation by alpha(v)beta(3)/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response. *Am J Pathol* 149, 911-921.

Stewart,C.R., Tseng,A.A., Mok,Y.F., Staples,M.K., Schiesser,C.H., Lawrence,L.J., Varghese,J.N., Moore,K.J., and Howlett,G.J. (2005). Oxidation of low-density lipoproteins induces amyloid-like structures that are recognized by macrophages. *Biochemistry* 44, 9108-9116.

Stewart,C.R., Stuart,L.M., Wilkinson,K., van Gils,J.M., Deng,J., Halle,A., Rayner,K.J., Boyer,L., Zhong,R., Frazier,W.A., Lacy-Hulbert,A., Khoury,J.E., Golenbock,D.T., and Moore,K.J. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.* 11(2):155-61.

Stocker,R. and Keaney,J.F., Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* *84*, 1381-1478.

Stoneman,V., Braganza,D., Figg,N., Mercer,J., Lang,R., Goddard,M., and Bennett,M. (2007). Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circ. Res* *100*, 884-893.

Stuart,L.M., Deng,J., Silver,J.M., Takahashi,K., Tseng,A.A., Hennessy,E.J., Ezekowitz,R.A., and Moore,K.J. (2005). Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* *170*, 477-485.

Stuart,L.M., Bell,S.A., Stewart,C.R., Silver,J.M., Richard,J., Goss,J.L., Tseng,A.A., Zhang,A., El Khoury,J.B., and Moore,K.J. (2007). CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex. *J. Biol. Chem.* *282*, 27392-27401.

Su,X. and Abumrad,N.A. (2009). Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab.* *20*(2):72-7.

Sugihara,K., Sugihara,T., Mohandas,N., and Hebbel,R.P. (1992). Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. *Blood* *80*, 2634-2642.

Sun,M., Finnemann,S.C., Febbraio,M., Shan,L., Annangudi,S.P., Podrez,E.A., Hoppe,G., Darrow,R., Organisciak,D.T., Salomon,R.G., Silverstein,R.L., and Hazen,S.L. (2006). Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *J. Biol. Chem.* *281*, 4222-4230.

Sun,B., Boyanovsky,B.B., Connelly,M.A., Shridas,P., van der Westhuyzen,D.R., and Webb,N.R. (2007). Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J. Lipid Res.* *48* (12), 2560-2570.

Sun,J., Hopkins,B.D., Tsujikawa,K., Perruzzi,C., Adini,I., Swerlick,R., Bornstein,P., Lawler,J., and Benjamin,L.E. (2009). Thrombospondin-1 modulates VEGF-A-mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* *296*, H1344-H1351.

Susztak,K., Ciccone,E., McCue,P., Sharma,K., and Bottinger,E.P. (2005). Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy. *PLoS. Med.* *2*, e45.

Suzuki,T., Kono,H., Hirose,N., Okada,M., Yamamoto,T., Yamamoto,K., and Honda,Z. (2000). Differential involvement of Src family kinases in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol.* *165*, 473-482.

Swerlick,R.A., Lee,K.H., Wick,T.M., and Lawley,T.J. (1992). Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J. Immunol.* *148*, 78-83.

Swirski,F.K., Pittet,M.J., Kircher,M.F., Aikawa,E., Jaffer,F.A., Libby,P., and Weissleder,R. (2006). Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 10340-10345.

Szabo,A., Varga,R., Keresztes,M., Vizler,C., Nemeth,I., Razga,Z., and Boros,M. (2009). Ischemic limb preconditioning downregulates systemic inflammatory activation. *J Orthop. Res* *27*, 897-902.

Takagi,T., Forrest,M.J., and Brooks,P.M. (1987). A pharmacological and histological examination of the microcirculation of the rat subcutaneous air-pouch: microcirculation of the rat air-pouch. *Pathology* *19*, 294-298.

Takahashi,K., Takeya,M., and Sakashita,N. (2002). Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc* *35*, 179-203.

Takamatsu,Y., Shimada,K., Chijiwa,K., Kuroki,S., Yamaguchi,K., and Tanaka,M. (2004). Role of leukotrienes on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Surg. Res* *119*, 14-20.

Talle,M.A., Rao,P.E., Westberg,E., Allegar,N., Makowski,M., Mittler,R.S., and Goldstein,G. (1983). Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cell Immunol.* *78*, 83-99.

Tamminen,M., Mottino,G., Qiao,J.H., Breslow,J.L., and Frank,J.S. (1999). Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *19*, 847-853.

Tandon,N.N., Lipsky,R.H., Burgess,W.H., and Jamieson,G.A. (1989). Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). *J. Biol. Chem.* *264*, 7570-7575.

Tang,Y., Taylor,K.T., Sobieski,D.A., Medved,E.S., and Lipsky,R.H. (1994). Identification of a human CD36 isoform produced by exon skipping. Conservation of exon organization and pre-mRNA splicing patterns with a CD36 gene family member, CLA-1. *J. Biol. Chem.* *269*, 6011-6015.

Tangirala,R.K., Bischoff,E.D., Joseph,S.B., Wagner,B.L., Walczak,R., Laffitte,B.A., Daige,C.L., Thomas,D., Heyman,R.A., Mangelsdorf,D.J., Wang,X., Lusis,A.J., Tontonoz,P., and Schulman,I.G. (2002). Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 11896-11901.

Tao,N., Wagner,S.J., and Lublin,D.M. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J. Biol. Chem.* 271, 22315-22320.

Taylor,K.T., Tang,Y., Sobieski,D.A., and Lipsky,R.H. (1993). Characterization of two alternatively spliced 5'-untranslated exons of the human CD36 gene in different cell types. *Gene* 133, 205-212.

Tessier,P.A., Naccache,P.H., Clark-Lewis,I., Gladue,R.P., Neote,K.S., and McColl,S.R. (1997). Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol.* 159, 3595-3602.

Thorne,R.F., Marshall,J.F., Shafren,D.R., Gibson,P.G., Hart,I.R., and Burns,G.F. (2000). The integrins alpha3beta1 and alpha6beta1 physically and functionally associate with CD36 in human melanoma cells. Requirement for the extracellular domain OF CD36. *J. Biol. Chem.* 275, 35264-35275.

Tirziu,D., Moodie,K.L., Zhuang,Z.W., Singer,K., Helisch,A., Dunn,J.F., Li,W., Singh,J., and Simons,M. (2005). Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 112, 2501-2509.

Titterington, J.S., Sukhanov, S., Higashi,Y., Vaughn,C., Bowers, C., Delafontaine, P. (2009). Growth hormone-releasing peptide-2 suppresses vascular oxidative stress in ApoE-/- mice but does not reduce atherosclerosis. *Endocrinology.* 150(12):5478-87.

Tontonoz,P., Nagy,L., Alvarez,J.G., Thomazy,V.A., and Evans,R.M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93, 241-252.

Tontonoz,P. and Nagy,L. (1999). Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 10, 485-490.

Tontonoz,P. and Mangelsdorf,D.J. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol. Endocrinol.* 17, 985-993.

Tontonoz,P. and Spiegelman,B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289-312.

Torsello, A., Luoni, M., Schweiger, F., Grilli, R., Guidi, M., Bresciani, E., Deghenghi, R., Müller, E.E., Locatelli, V. (1998). Novel hexarelin analogs stimulate feeding in the rat through a mechanism not involving growth hormone release. *Eur J Pharmacol.* 360 (2-3):123-129.

Torsello,A., Bresciani,E., Rossoni,G., Avallone,R., Tulipano,G., Cocchi,D., Bulgarelli,I., Deghenghi,R., Berti,F., and Locatelli,V. (2003). Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology* 144, 1787-1792.



Torra,I.P., Ismaili, N., Feig, J.E., Xu, C.F., Cavaotto, C., Pancratov, R., Rogatsky, I., Neubert, T.A., Fisher, E.A., Garabedian, M.J. (2008). Phosphorylation of liver X receptor  $\alpha$  selectively regulates target gene expression in macrophages. *Mol Cell Biol* 28:2626-2636.

Toussaint,J. (2003) Athérosclérose - Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques. Masson.

Triantafilou,M., Gamper,F.G., Haston,R.M., Mouratis,M.A., Morath,S., Hartung,T., and Triantafilou,K. (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J. Biol. Chem.* 281, 31002-31011.

Tuomisto, T.T., Riekkinen, M.S., Viita, H., Levonen, A.L., Yla-Herttuala, S. (2005). Analysis of gene and protein expression during monocyte-macrophage differentiation and cholesterol loading-cDNA and protein array study. *Atherosclerosis*.180:283-291

Ushio-Fukai,M., Alexander,R.W., Akers,M., Yin,Q., Fujio,Y., Walsh,K., and Griendling,K.K. (1999). Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 274, 22699-22704.

Van Berkel,T.J., Out,R., Hoekstra,M., Kuiper,J., Biessen,E., and Van,E.M. (2005). Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr. Opin. Lipidol.* 16, 525-535.

van Buul,J.D. and Hordijk,P.L. (2004). Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 824-833.

Van Nieuwenhoven,F.A., Verstijnen,C.P., Abumrad,N.A., Willemsen,P.H., Van Eys,G.J., Van der Vusse,G.J., and Glatz,J.F. (1995). Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 747-752.

Vandal,K., Rouleau,P., Boivin,A., Ryckman,C., Talbot,M., and Tessier,P.A. (2003). Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 171, 2602-2609.

van der Vusse, G. (2009). Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* 24 (4), 300-307.

Vergnes,L., Phan,J., Strauss,M., Tafuri,S., Reue,K.(2003) Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem.* 278(44):42774-84.

Vicente-Manzanares,M. and Sanchez-Madrid,F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 110-122.

Vistisen,B., Roepstorff,K., Roepstorff,C., Bonen,A., van,D.B., and Kiens,B. (2004). Sarcolemmal FAT/CD36 in human skeletal muscle colocalizes with caveolin-3 and is more abundant in type 1 than in type 2 fibers. *J. Lipid Res.* *45*, 603-609.

von Hundelshausen,P., Weber,K.S., Huo,Y., Proudfoot,A.E., Nelson,P.J., Ley,K., and Weber,C. (2001). RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* *103*, 1772-1777.

von Hundelshausen,P., Koenen,R.R., Sack,M., Mause,S.F., Adriaens,W., Proudfoot,A.E., Hackeng,T.M., and Weber,C. (2005). Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* *105*, 924-930.

Vora, D.K., Fang, Z.T., Liva, S.M., Tyner, T.R., Parhami, F., Watson, A.D., Drake, T.A., Territo, M.C., Berliner, J.A. (1997). Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res* *80*: 810–818.

Watson,J.M., Harding,T.W., Golubovskaya,V., Morris,J.S., Hunter,D., Li,X., Haskill,J.S., and Earp,H.S. (2001). Inhibition of the calcium-dependent tyrosine kinase (CADTK) blocks monocyte spreading and motility. *J Biol Chem.* *276*, 3536-3542.

Weber,C., Zernecke,A., and Libby,P. (2008). The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 802-815.

Weinberg,J.B., Blinder,R.A., and Coleman,R.E. (1986). In vitro function of indium-111 oxine-labeled human monocytes. *J Immunol. Methods* *95*, 9-14.

Wiedermann, C.J., Kowald, E., Reinisch, N., Kaehler, C.M., von Luetlichau, I., Pattison, J.M., Huie, P., Sibley, R.K., Nelson, P.J., Krensky, A.M. (1993). Monocyte haptotaxis induced by the RANTES chemokine. *Curr Biol.* *3*(11):735-9.

Wight, T.N., Merrilees, M.J. (2004). Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* *94*(9):1158-67.

Wilkinson,B., Koenigsknecht-Talboo,J., Grommes,C., Lee,C.Y., and Landreth,G. (2006). Fibrillar beta-amyloid-stimulated intracellular signaling cascades require Vav for induction of respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia. *J. Biol. Chem.* *281*, 20842-20850.

Williams,K.J., Fless,G.M., Petrie,K.A., Snyder,M.L., Brocia,R.W., and Swenson,T.L. (1992). Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *267*, 13284-13292.

Williams,K.J. and Tabas,I. (1998). The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 471-474.

Williams,H., Johnson,J.L., Carson,K.G., and Jackson,C.L. (2002). Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 788-792.

Wilmsen,H.M., Ciaraldi,T.P., Carter,L., Reehman,N., Mudaliar,S.R., and Henry,R.R. (2003). Thiazolidinediones upregulate impaired fatty acid uptake in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 285, E354-E362.

Wintergerst,E.S., Jelk,J., Rahner,C., and Asmis,R. (2000). Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3. *Eur. J. Biochem.* 267, 6050-6059.

Wooton-Kee,C.R., Boyanovsky,B.B., Nasser,M.S., de Villiers,W.J., and Webb,N.R. (2004). Group V sPLA2 hydrolysis of low-density lipoprotein results in spontaneous particle aggregation and promotes macrophage foam cell formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 762-767.

Worthylake,R.A. and Burridge,K. (2001). Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol* 13, 569-577.

Wu,R., Zhou,M., Cui,X., Simms,H.H., and Wang,P. (2004). Upregulation of cardiovascular ghrelin receptor occurs in the hyperdynamic phase of sepsis. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* 287, H1296-H1302.

Wyler,B., Daviet,L., Bortkiewicz,H., Bordet,J.C., and McGregor,J.L. (1993). Cloning of the cDNA encoding human platelet CD36: comparison to PCR amplified fragments of monocyte, endothelial and HEL cells. *Thromb. Haemost.* 70, 500-505.

Xi,CX., Xiong, F., Zhou, Z., Mei, L., Xiong, WC. PYK2 interacts with MyD88 and regulates MyD88-mediated NF-kappaB activation in macrophages. (2010) *J Leukoc Biol.* 87(3):415-23.

Yamamoto,N., Akamatsu,N., Sakuraba,H., Yamazaki,H., and Tanoue,K. (1994). Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood* 83, 392-397.

Yanai,H., Chiba,H., Fujiwara,H., Morimoto,M., Abe,K., Yoshida,S., Takahashi,Y., Fuda,H., Hui,S.P., Akita,H., Kobayashi,K., and Matsuno,K. (2000a). Phenotype-genotype correlation in CD36 deficiency types I and II. *Thromb. Haemost.* 84, 436-441.

Yanai,H., Chiba,H., Morimoto,M., Jamieson,G.A., and Matsuno,K. (2000b). Type I CD36 deficiency in humans is not associated with insulin resistance syndrome. *Thromb. Haemost.* 83, 786.

Yancey,P.G., Bortnick,A.E., Kellner-Weibel,G., Llera-Moya,M., Phillips,M.C., and Rothblat,G.H. (2003). Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 712-719.

Yang,Y., Chen,M., Loux,T.J., and Harmon,C.M. (2007). Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells. *Pediatr. Surg. Int.* 23, 675-683.

Yassin,M.M., Harkin,D.W., Barros D'Sa,A.A., Halliday,M.I., and Rowlands,B.J. (2002). Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J. Surg.* 26, 115-121.

Ye,Y., Nishi,S.P., Manickavasagam, S., Lin,Y., Huang, M.H., Perez-Polo, J.R., Uretsky, B.F., Birnbaum, Y. (2007) Activation of peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) by atorvastatin is mediated by 15-deoxy-delta-12,14-PGJ2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84:43-53.

Yesner,L.M., Huh,H.Y., Pearce,S.F., and Silverstein,R.L. (1996). Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 1019-1025.

Yoshida,M., Westlin,W.F., Wang,N., Ingber,D.E., Rosenzweig,A., Resnick,N., and Gimbrone,M.A., Jr. (1996). Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 133, 445-455.

Yu,S., Cao,W.Q., Kashireddy,P., Meyer,K., Jia,Y., Hughes,D.E., Tan,Y., Feng,J., Yeldandi,A.V., Rao,M.S., Costa,R.H., Gonzalez,F.J., and Reddy,J.K. (2001). Human peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) supports the induction of peroxisome proliferation in PPARalpha-deficient mouse liver. *J. Biol. Chem.* 276, 42485-42491.

Zarbock,A., Lowell,C.A., and Ley,K. (2007). Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity.* 26, 773-783.

Zeng,Y., Tao,N., Chung,K.N., Heuser,J.E., and Lublin,D.M. (2003). Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 278, 45931-45936.

Zernecke,A. and Weber,C. (2005). Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Res Cardiol* 100, 93-101.

Zernecke,A., Shagdarsuren,E., and Weber,C. (2008). Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1897-1908.

Zhang,W.Y., Ishii,I., and Kruth,H.S. (2000). Plasmin-mediated macrophage reversal of low density lipoprotein aggregation. *J. Biol. Chem.* 275, 33176-33183.

Zhao,M., Liu,Y., Wang,X., New,L., Han,J., and Brunk,U.T. (2002). Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *APMIS 110*, 458-468.

Zhao,Z., de Beer,M.C., Cai,L., Asmis,R., de Beer,F.C., de Villiers,W.J., and van der Westhuyzen,D.R. (2005). Low-density lipoprotein from apolipoprotein E-deficient mice induces macrophage lipid accumulation in a CD36 and scavenger receptor class A-dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 168-173.

Zhou,J., Zhai,Y., Mu,Y., Gong,H., Uppal,H., Toma,D., Ren,S., Evans,R.M., and Xie,W. (2006). A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 15013-15020.

Zimmerman,B.J. and Granger,D.N. (1994). Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sci.* 307, 284-292.

*Encyclopaedia Britannica.* <http://www.britannica.com/>

*Foundation des maladies du Coeur.* <http://www.fmcoeur.com/>

*Léoni, J. Physiopathologie de l'athérosclérose.*  
<http://www.123bio.net/revues/jleoni/2chap4.html>

*Pour un canada au cœur qui bat, 2009. Stratégie canadienne de santé cardiovasculaire et plan d'action.* <http://www.chhs-scsc.ca>

*Statistiques canada.* <http://www.statcan.gc.ca/>

*The American Type Culture Collection (ATCC).* [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

